

Virulenz und Identifikation von oralen Laktobazillen

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Alexandra Uhlemann, geboren am 23.10.1980 in Plauen
und Sabine Hesse, geboren am 13.09.1980 in Weimar

Jena 2006

Gutachter:

1. _____

2. _____

3. _____

Tag der öffentlichen Verteidigung: _____

1 Zusammenfassung

Karies ist so alt wie die Menschheit und ist heute noch die am weitesten verbreitete Volkskrankheit. Sie hat eine multifaktorielle Genese mit einer mikrobiellen Komponente. So wird die Mundhöhle Neugeborener bereits durch den Geburtsvorgang mit Laktobazillen mütterlichen Ursprungs transient infiziert; Laktobazillen etablieren sich dann erst wieder zwischen dem 2. bis 5. Lebensjahr in der Mundhöhle (Carlson 1975). Hohe Laktobazillenzahlen im Speichel werden heute als Indikatoren eines hohen Zuckerkonsums angesehen. Einmal in der Mundhöhle etabliert, treiben Laktobazillen in kariösen Kavitäten durch ihre Milchsäureproduktion den Kariesprozess voran und haben eine große Bedeutung für die Auslösung einer Sekundärkaries. Inwieweit sich Laktobazillen auch in tiefen Fissuren, in denen ihr mangelndes Haftvermögen für die Kariesinitiation bedeutungslos ist, vermehren und die Zahnhartgewebe demineralisieren, wird heute diskutiert. So konnte Baake (2003) in vitro die hohe Säuretoleranz von Laktobazillen aufzeigen, die sogar die der Mutans-Streptokokken übersteigt (Bergholz 2002), so dass Laktobazillen in Fissuren und unversorgten Kavitäten Mutans-Streptokokken sogar überleben könnten. Die vorliegenden Untersuchungen widmeten sich der Taxonomie und der Bacteriocinogenität der Laktobazillen und sollen zum Verständnis der Ätiopathogenese der Karies beitragen.

20 Laktobazillenstämme (*L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. coryniformis* ss *torquens*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. casei*, *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* [*L. casei* ss *rhamnosus*], *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. alimentarius*, *L. zeae*, *L. salivarius* ss *salivarius*, *L. plantarum*, *L. paracasei* ss *paracasei*) von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) wurden anhand ihres Membranfettsäurespektrums gaschromatographisch mit dem Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) charakterisiert. Das Membranfettsäuremuster wurde mit dem von Referenzstämmen in der Datenbank des Microbial Identification System verglichen. Dabei wurden 10fach Bestimmungen nach jeweils 24- und 48ständiger anaerober Anzucht (GasPak, BBL) der Stämme in Peptone-Yeast-Extrakt-Tween-80-Bouillon (Moore 1994) bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Es konnten nur vier der 20 Referenzstämme (*L. coryniformis* ss *torquens*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. reuteri*, *L. paracasei* ss *paracasei*) sowohl nach 24- als auch nach 48stündiger Bebrütung bestätigt werden. Ein weiterer Stamm (*L. buchneri*) wurde nach nur 24stündiger und zwei weitere Stämme (*L. brevis*, *L. acidophilus*) nach nur 48stündiger Anzucht korrekt charakterisiert. Die übrigen 13 Laktobazillenstämme konnten weiterhin in zwei Gruppen unterteilt werden. 7 Stämme (*L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* [*L. casei* ss *rhamnosus*], *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. zeae*, *L. alimentarius*) wurden nicht in Übereinstimmung zur Referenz der DSMZ eingeordnet, wohl aber als gleiche Art nach 24- wie auch nach 48stündiger Bebrütung. Die 6 übrigen Stämme (*L. paracasei* ss *tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* ss *delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*) wurden nach beiden Bebrütungszeiten unterschiedlichen Taxa zugeordnet, die völlig diskordant zur jeweiligen Referenz lagen.

Weiterhin wurden die 20 Referenzstämme hinsichtlich ihrer Bacteriocinogenität untersucht. Ausgewählte Streptokokken wurden als Indikatorstämme (*S. mutans* [c] NCTC 10449, Ingbritt, *S. mutans* [e] LM7, V100, *S. mutans* [f] QP50-1, SE11, *S. sobrinus* [d] OMZ 176, *S. sobrinus* [g] OMZ 65, *S. sanguis* OMZ 9S, HG1473, *S. oralis* HG1290, HG1601, *S. mitis* OMZ 8, *S. gordonii* HG295, *S. salivarius* OMZ 47) herangezogen. Die Bacteriocinogenität wurde mit Hilfe des Agardiffusionstests in Übereinstimmung zu Scharff (2004) untersucht. 13 (*L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. coryniformis* ss *torquens*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. alimentarius*, *L. zeae*, *L. salivarius* ss *salivarius*, *L. plantarum*, *L. paracasei* ss *paracasei*) der 20 Laktobazillen (65%) erwiesen sich als bacteriocinogen. Unter den Teststämmen waren *L. salivarius* ss *salivarius* und *L. plantarum* mit einer Bacteriocinogenität von je 85% die stärksten Bacteriocinbildner. Laktobazillenstämme wie *L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus* und *L. alimentarius* waren mit einer Bacteriocinogenität von 7% schwache Bacteriocinbildner. Zusammenfassend bildeten die oralen Laktobazillen mehrheitlich Bacteriocine. Mit einem Hemmhofdurchmesser von 20,5 mm verursachte *L. zeae* im Bakterienrasen von *S. oralis* HG1601 die größte Hemmzone. Der durchschnittlich gebildete Hemmhofdurchmesser aller bacteriocinogenen Teststämmen lag bei 12,4 mm. Bei den Indikatorstämmen wurden die Mutans- und Nicht-Mutans-Streptokokken durch die gebildeten Bacteriocine im Wachstum gehemmt. 23% der bacteriocinogenen Teststämmen hemmten

durchschnittlich eine Nicht-Mutans-Streptokokke. Die Mutans-Streptokokken wurden jeweils im Durchschnitt von 15% der bacteriocinogenen Laktobazillenstämmen inhibiert. Somit bestand mehrheitlich eine Hemmung der Nicht-Mutans-Streptokokken durch die Teststämmen. Weiterhin waren die durchschnittlich gebildeten Hemmhofdurchmesser im Indikatorstammrassen durch die bacteriocinogenen Laktobazillenstämmen bei den Nicht-Mutans-Streptokokken (13,7 mm) größer als bei Mutans-Streptokokken (10,6 mm).

Von den Mutans-Streptokokken mit den Serotypen c, e, f reagierte *S. mutans* (e) LM7 gegenüber 40% der gebildeten Bacteriocine sensibel und erwies sich als die am stärksten gehemmte Streptokokke. *S. sobrinus* (g) OMZ 65 war der einzige Stamm, der nicht in seinem Wachstum unterdrückt wurde. Die Nicht-Mutans-Streptokokken *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. salivarius* und *S. sanguis* erwiesen sich in ihrer Gesamtheit gegenüber den gebildeten Bacteriocinen als sensibel.

2.1 Zum ubiquitären Vorkommen von Laktobazillen

Laktobazillen sind auf Grund ihrer angepassten Lebensweise und ihrer Nahrungsbedürfnisse ubiquitär verbreitet und in vielen Bereichen unseres Lebens von großer Bedeutung. Sie kolonisieren den Darm, den weiblichen Genitaltrakt und ebenso die Schleimhäute von Säugetieren. In Milch, Milchprodukten und allen Orten, die mit Milch in Berührung kommen, sind Laktobazillen nachweisbar. In lebenden und zersetzten Pflanzen sind sie gleichfalls anzutreffen. Eine wichtige Rolle spielen Laktobazillen in der Landwirtschaft, bei der Fermentation von Pflanzen, im Haushalt und weiterhin in der milchverarbeitenden- sowie in der Lebensmittelindustrie.

Laktobazillen sind fakultativ bzw. obligat homofermentativ bzw. heterofermentativ. Die Fermentation bzw. Gärung ist allgemein ein ATP-regenerierender Stoffwechselprozess, bei dem es zur Spaltung des organischen Substrats kommt. Nach den mengenmäßig vorherrschenden oder besonders charakteristischen Endprodukten wird zwischen Alkoholgärung, Milchsäuregärung, Propionsäuregärung, Ameisensäuregärung, Buttersäuregärung und Essigsäuregärung unterschieden. Sauerstoff, in seiner Rolle bereits von Pasteur mit den Worten „La fermentation est la vie sans l'air“ („Gärung ist das Leben ohne Sauerstoff“) beschrieben, ist an Gärungsprozessen nicht beteiligt (Pasteur 1877).

Bei der Milchsäurefermentation produzieren die homofermentativen Laktobazillen bei nahezu vollständiger Glykolyse aus Glukose etwa 90% Milchsäure oder deren Salz, das Laktat, als Endprodukt; nur zu einem kleinen Anteil können Pyruvat, Acetat, Ethanol oder Acetoin gebildet werden. Heterofermentativen Stämmen mangelt es an der Aldolase, einem Enzym innerhalb der Glykolyse. Sie verstoffwechseln die Glukose daher nicht über die Glykolyse, sondern über den alternativen Phosphoglukonat-Weg (Brock et al. 2001).

Die Milchsäuregärung wird seit alters her zur Konservierung von Pflanzen und Früchten und in der Landwirtschaft zur Konservierung von Futtermitteln eingesetzt. In Silos oder Großballen werden Laktobazillen zunächst als Trockenmasse zugesetzt. Unter Luftabschluss kommt es dann zum Verbrauch des Restsauerstoffes und somit zur anaeroben Gärung. Der Restzucker der Pflanzen wird dabei in Milchsäure überführt und der pH-Wert sinkt in der Silage. Bei pH-Werten von 4,0 bis 4,5 werden vor allem Gärschädlinge in ihrem Wachstum gehemmt und die Haltbarkeit der Silagen erheblich verlängert. Pflanzen sind ein natürliches Reservoir von Laktobazillen, auch wenn nach Untersuchungen von Mundt und Hammer (1968) Laktobazillen in Pflanzen im

Vergleich zu Streptokokken mengenmäßig in der Unterzahl sind. *L. plantarum* ist ubiquitär verbreitet und spielt deshalb auch in der Lebensmittelindustrie als Impfkultur die größte Rolle (61%). Die zweithäufigste Art in Impfkulturen ist mit 23% *L. acidophilus*. Zusätzlich kommen neben *L. brevis* (16%), *L. lactis* (6%) und *L. bulgaricus* (5%) aber auch *Pediococcus acidilactici* (19%) und *Streptococcus cremoris* (14%) vor (Pahlow und Honig 1986). Kroonemann et al. (2002) isolierten aus Maissilage *L. diolivorans* sp. nov. als eine neue Art innerhalb der heterofermentativen „buchneri-Gruppe“.

Die Milchsäurefermentation schützt Gemüse und Früchte allgemein vor dem Verderb. Die bekanntesten und am meisten verbreiteten Gemüseprodukte sind das Sauerkraut, saure Gurken, Schnittbohnen sowie Oliven. Nach Untersuchungen von Randazzo et al. (2004) konnte *L. casei* als dominierende Art in natürlich gegorenen sizilianischen grünen Oliven nachgewiesen werden. Vor allem in asiatischen und afrikanischen Ländern werden diverse Gemüsesorten milchsauer vergoren. Durch die von Lee et al. (2004) angewandte multiplex basierende Restriktionsenzymanalyse konnten *L. sakei* und *L. curvatus* in Kimchi, einem traditionell gegorenem Kohlprodukt aus Südkorea, isoliert werden. Bei der Fermentation von Sauerkraut liegt von Beginn der Gärung an eine Zunahme von Entero- und Milchsäurebakterien vor. Bei ansteigender Temperatur sinkt die Anzahl der Enterobakterien zugunsten der Laktobazillen. Nach Buckenhüskes et al. (1986) dominiert bei der Sauerkrautvergärung zunächst *Leuconostoc mesenteroides* und später, bei sinkendem pH-Wert, vermehren sich temperaturabhängig homofermentative Laktobazillen. Zu Letzteren zählen *L. plantarum* (frühere Bezeichnung: *L. cucumeris*), *L. sakei* und die etwas seltener vorkommende Laktobazille *L. curvatus*. Arten der Gattungen *Lactococcus*, *Enterococcus* und *Pediococcus* wurden auch nachgewiesen; ihre Prävalenz lag aber unter 10% (Kandler et al. 1986).

Bei der Brotherstellung wurde früher von einem „spontanen“ Sauerteig ausgegangen bzw. von einem „Mutterteig“ (*masa madre*). Seit über 60 Jahren werden zur Brotherstellung auch Laktobazillenstämme als Sauerteigkulturen („Starterkulturen“) eingesetzt. Dadurch kann die Qualität des Brotes durch die definierte Zusammensetzung der „Starterkulturen“ gleich gehalten werden (Spicher 1987). Heute bevorzugen die Konsumenten immer häufiger „Sauerteigbrot“ gegenüber Brot, bei dem lediglich das Roggenmehl gesäuert wird (Spicher 1984).

Die Starterkulturen für den Sauerteig sind Mischkulturen in unterschiedlichem Verhältnis. Sowohl heterofermentative Laktobazillen wie *L. sanfrancisco* und *L. brevis* als auch fakultativ homofermentative Laktobazillen wie *L. plantarum* sind bei der Haltbarkeit von Sauerteigbrot von großer Bedeutung (Martinez-Anaya et al. 1994). Nach Böcker und Hammes (1990) besteht die Mikroflora des Sauerteiges zu 99,9% aus drei Laktobazillenstämmen; *L. sanfrancisco* wurde dabei mit 90 bis 95% am häufigsten isoliert. Nach jüngsten Untersuchungen gelang es Messens et al. (2002) aus Sauerteig ein Bacteriocin von Laktobazillen zu gewinnen, dass als neues Antibiotikum „Reutericyclin“ aufgenommen wurde.

Auch in der Milch- und Käseindustrie finden Laktobazillen ihren Einsatz. Milch ist, wenn sie das Euter der Kuh verlässt keimfrei, wird dann aber schnell mit Laktobazillen kontaminiert. Obwohl in frischer Milch nur geringe Laktobazillenzahlen nachgewiesen wurden und auch durch die Hitzebehandlung der Milch viele Laktobazillen nicht überleben können, werden gewöhnlich *L. casei* und *L. plantarum* aus Milch isoliert (Sharpe 1962). Die Laktobazillenflora der Milch findet sich auch in dem aus ihr hergestellten Käse wieder. Für die Käsereifung mit typischem Käsearoma und Käseduft spielen die Milchsäurebakterien eine wichtige Rolle (Weinrichter et al. 2004). Laktobazillen werden außerdem zusammen mit *Streptococcus thermophilus* bei der Herstellung von Emmentaler Käse und Bergkäse, eine Gruyere Artenkäsevielfalt aus pasteurisierter Milch, als Starterkulturen eingesetzt (Hammes et al. 1992). Im Mozzarella-Käse sind verschiedene homo- und heterofermentative Laktobazillen vorhanden; *L. fermentum* dominiert zu 96,5% unter den Milchsäurebakterien (Morea et al. 1998).

Die Eigenschaften der Laktobazillen werden auch in der Weinherstellung genutzt. Geschmack und Stabilität werden verbessert, da Malat im Gärungsprozess mit ansteigendem Säuregehalt in L(+)-Milchsäure und CO₂ umgewandelt wird. Den Weinen werden neben *L. plantarum* auch *L. brevis* und *L. casei* zugesetzt. De Orduna et al. (2001) konnten aufzeigen, dass das Wachstum von *L. buchneri* eindeutig von der Anwesenheit von Arginin im Wein abhängig ist und dass diese Laktobazille Arginin bei pH-Werten bis zu 3,3 abbauen kann. Rodas et al. (2005) konnten mit 16S rDNA-Restriktionsanalyse im Wein zusätzlich zu den schon genannten Laktobazillen *L. paracasei*, *L. mali* sowie *L. hilgardii* nachweisen. In der Bierbrauerei werden Milchsäurekulturen zur Optimierung der Enzymaktivitäten beim Maischen und zur Verkürzung der Gärungszeit eingesetzt. In Deutschland wird

eine saure Würze bei 48 – 50°C produziert und zu 1 – 2% der Maische hinzugefügt. Der pH-Wert der Maische sinkt dadurch um 0,2 bis 0,4 pH-Einheiten und das Bier wird geschmacklich verbessert; es schmeckt weicher und milder, schäumt besser und bekommt eine helle Farbe. Durch einen niedrigen pH-Wert zwischen 3,8 und 4,7 können sich bierschädliche Bakterien nur langsam vermehren und gramnegative Bakterien werden in ihrem Wachstum gehemmt (Back 1988). Für Laktobazillen sind Brauereien ein natürlicher Lebensraum an den sie sich speziell angepasst haben, so dass sie nur sehr schwer unter Laborbedingungen kultivierbar sind (Jespersen und Jakobson 1996). Back untersuchte 1981 über 1000 Stämme aus Brauereien und fand neben *L. brevis*, *L. casei*, *L. lindneri* und *L. coryniformis* auch *Pediococcus damnosus*. 1987 konnte Back noch *L. curvatus*, *L. plantarum* und *L. buchneri* hinzufügen.

Bei der Herstellung von jamaikanischem Rum wurden auch Laktobazillen, die Arten *L. buchneri* und *L. brevis*, nachgewiesen (Tilbury 1975).

In der Zuckerindustrie sind Milchsäurebakterien gefürchtet. Durch ihre fermentativen Eigenschaften und ihre extreme Säuretoleranz sind die Milchsäurebakterien in der Lage im Zuckersaft zu wachsen und sich zu vermehren. Dies hat zwei schädliche Folgen. Einerseits kommt es durch Säurebildung zu einem Saccharoseverlust und andererseits zur Dextranbildung, so dass der Zucker verdirbt. In den ersten drei bis vier Tagen nach der Ernte konnten 10^7 bis 10^8 Keime pro ml Zuckersaft nachgewiesen werden; am häufigsten *Leuconostoc mesenteroides* sowie *L. dextranicum*. Nachfolgend bestand die überwiegende Mikroflora aus Laktobazillen, nämlich aus *L. casei*, *L. alactosus* und *L. plantarum* (Tilbury 1975).

In der Fleisch- und Wurstindustrie sind Laktobazillen ebenso unerwünscht. Die typischen Eigenschaften der Laktobazillen, wie zum Beispiel die Toleranz gegenüber hohen CO_2 -Konzentrationen, Nitrit, Salz sowie niedrigen pH-Werten, führt dazu, dass sich Laktobazillen in Fleisch und Fleischprodukten gut vermehren; Fleisch und Wurst verderben (Sharpae 1981).

In besonders hoher Anzahl wurden Laktobazillen in geräucherter und gepökelter Wurst nachgewiesen (Reuter 1975, Shaw und Harding 1984). Laktobazillen produzieren H_2O_2 sowie H_2S , die durch die sich anschließende Reaktion mit Myoglobin zur Ungenießbarkeit des Lebensmittels führt. Die Anzahl der Laktobazillen in verdorbenem Fleisch liegt bei 10^7 bis 10^8 /g. *L. sake* kam nach Untersuchungen von Hastings und Holzappel (1986) in Rindfleisch am häufigsten vor.

2.2 Zum Vorkommen von Laktobazillen im menschlichen Körper

Über den Verdauungstrakt besitzt der Mensch die größte Kontaktfläche mit der Umwelt. Unmittelbar nach der Geburt des Menschen bietet der Verdauungstrakt durch seine relativ große Oberfläche den Mikroorganismen eine optimale Besiedlungsmöglichkeit. Während des Geburtsvorganges kommt es zur oralen Erstkontamination mit Keimen der mütterlichen Vaginalflora und anschließend mit Keimen der Perianalfora, so dass sich beim Neugeborenen zunächst eine initiale, orale Mikroflora ausbildet (Krasse 1988). Dass es sich bei den Erstbesiedlern des Kindes tatsächlich um die Keime der Mutter handelt, konnten Gereau et al. (1959) am Beispiel von *E. coli* und Franciosi et al. (1973) am Beispiel von *B. Streptokokken* zeigen. Über die Mundhöhle besteht ein ständiger Kontakt mit der Umwelt und ihren Mikroorganismen. Letztere werden aufgenommen, wieder ausgeschieden, gedeihen in der Natur unter bestimmten Umweltbedingungen und gelangen über die Nahrung wieder zurück in die Mundhöhle des Menschen; der natürliche Kreislauf ist geschlossen (Mundt und Hammer 1968). Durch die anatomischen Gegebenheiten in der Mundhöhle bestehen unterschiedliche Nischen, die optimal für die Bakterienansiedlung sind. So bildet zum Beispiel die Fissur eine ökologische Nische für Laktobazillen und Mutans-Streptokokken. Die bakterielle Milchsäureproduktion und die mangelnde Selbstreinigung der Fissur lassen sie zum *Locus minoris resistentiae* werden (Nagano 1960, Lussi und Schaffner 2002, Lussi et al. 2003). Laktobazillen sind Schleimhautparasiten, können an den Zahnflächen nicht haften, finden aber in der tiefen Fissur und in der kariösen Kavität eine Nische. Beide Keimgruppen bilden aus Kohlenhydraten der Nahrung Milchsäure, die die Demineralisation der Zahnhartgewebe auslöst bzw. vorantreibt. Laktobazillen sind transient unmittelbar nach der Geburt in der Mundhöhle nachweisbar und etablieren sich erneut im 3. bis 4. Lebensjahr (Carlsson 1975). Laktobazillen etablieren sich in der Mundhöhle in geringerem Umfang als Streptokokken; es konnten hauptsächlich *L. casei*, *L. casei* ss *rhamnosus* und gelegentlich *L. acidophilus* und *L. fermentum* nachgewiesen werden (Sharpae 1981). Shovlin und Gillis (1972) isolierten Stämme von *L. casei* aus tiefen Plaqueschichten. In der Plaque kommen Laktobazillen allerdings nur mit einer geringen Prävalenz vor. Ihre Prävalenz in der gesamten Mundhöhle liegt bei ca. 1% (Hardie und Bowden 1974). Rogosa et al. (1953) identifizierten 500 Laktobazillenstämme aus dem Speichel von 130 Schulkindern. *L. casei* und *L. fermentum* waren zu 59% und 45% die dominierenden Arten, gefolgt von *L. acidophilus* (22%) und *L. brevis* (17%); *L. buchneri*, *L. salivarius*,

L. plantarum und *L. cellobiosus* kamen weniger häufig vor. Smith et al. (2001) konnten in kariösen Kavitäten mit unterschiedlichen Prävalenzen *L. brevis* (24,6%), *L. fermentum* (18,5%), *L. casei* (16,9%), *L. delbrueckii* (15,4%), *L. plantarum* (9,2%), *L. acidophilus* (7,7%), *L. jensenii* (4,2%), *L. salivarius* und *L. gasseri* (zu je 1,5%) nachweisen.

Bis in die 50er Jahre des letzten Jahrhunderts bestand ein wissenschaftlicher Meinungsstreit, ob Laktobazillen oder Mutans-Streptokokken größere Bedeutung für die Kariesauslösung haben oder nicht. So beschäftigten sich Johnston et al. (1933) in umfassenden Studien mit der Rolle der *Acidophilus*-Gruppe bei der Kariesentstehung. Die Autoren relativierten die Bedeutung der Laktobazillen, denn an 183 Ratten konnten sie im Tierversuch demonstrieren, dass Zucker in der Diät kariesfreier Tiere nicht zur Zunahme der Keimzahlen von *L. acidophilus* führte. Zeitgemäß führte die Entwicklung der restaurativen Zahnheilkunde zur Versorgung kariöser Kavitäten und damit verbunden zur Beseitigung der ökologischen Nischen für Laktobazillen und somit zur Reduktion der Häufigkeit ihres Nachweises im Speichel. Umgekehrt gelang häufiger der Nachweis von oralen Streptokokken. Im Ergebnis gnotobiotischer und konventioneller Tierexperimente in der Mitte der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts gelang bei Versuchstieren die Kariesauslösung nach Streptokokkeninfektion und Verabreichung zuckerhaltiger Diät (Orland et al. 1954, 1955, Loesche 1986). Streptokokken wurden nun als Verursacher der Kariesauslösung angesehen. Dennoch wurde den Laktobazillen für die Kariesentstehung noch Bedeutung beigemessen, und sie wurden in weiteren Studien immer wieder aufgegriffen. So stellten Klimm et al. (1990) eine positive Korrelation zwischen Kariesbefall, Kariesanstieg und Keimzahlen von *S. mutans* und Laktobazillen zur Diskussion. Die Autoren bestimmten die koloniebildenden Einheiten (CFU, colony forming unit) und gaben für Laktobazillen Werte von > 100000 CFU pro ml Speichel als Zeichen eines erhöhten Kariesrisikos an. Diese positive Beziehung publizierten zuvor schon Kesel (1958) und nachfolgend auch Becks et al. (1994).

Neben der Mundhöhle wird auch der Gastrointestinaltrakt während der Geburt mit verschiedenen Bakterien überflutet. Nach Smith (1965) handelt es sich dabei um coliforme Keime, um Clostridien und andere Anaerobier, denen schnell die Laktobazillen folgen. Dass der Intestinaltrakt des Menschen ein natürlicher Lebensraum der Laktobazillen ist, bestätigte bereits Robinson und Thompson (1952). Eine wichtige Rolle bei der weiteren mikrobiellen Darmbesiedlung durch Laktobazillen spielt die

Ernährung des Babys bzw. Kleinkindes. Babys, die gestillt wurden, entwickelten eine stabile Darmflora aus Bifidobakterien und hatten seltener Koliken oder andere Verdauungsstörungen (Mata et al. 1972, Shahani und Ayebo 1980). Robinson und Thompson (1952) zeigten, dass gestillte Kinder auch schneller an Gewicht zunahmen als Kinder, die mit der Flasche ernährt wurden. Die Darmflora von Kindern, die mit Kuhmilch gefüttert wurden, bestand weiterhin zu einem höheren Anteil aus *Escherichia coli* und nur zu einem geringen Anteil aus *L. bifidus* (Willis et al. 1973).

Bereits im Kindesalter von 2 bis 3 Jahren hat sich eine heterogene, mikrobielle Besiedlung in einer Größenordnung von etwa 10^{14} CFU Keimen auf den Körperoberflächen entwickelt, die aus bis zu 400 verschiedenen Bakterienarten besteht (Moore und Holdman 1974, Persin 1998, Servin 2004), besonders die Gattungen der Streptokokken, Propionibakterien, Bifidobakterien und Laktobazillen. Das sind 10- bis 100mal mehr als der Mensch Zellen besitzt. Die Familie der Milchsäurebakterien gehört zu den wichtigsten natürlichen Darmbesiedlern. Unter den Laktobazillen tragen *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* und *L. lactis* zur gesunden gastrointestinalen Mikroökologie bei (Fernandes et al. 1987). Sie vergären alle Kohlenhydrate zu Milchsäure. Laktobazillen sind hauptsächlich in der Mundhöhle und im Dünndarm anzutreffen; im Dickdarm und Jejunum dominieren anaerobe Bacteroide. Laktobazillen haben mit 0,7- bis 1%iger Prävalenz nur einen geringen Anteil (Sharpae 1981).

Die Mikroflora des Gastrointestinaltraktes unterliegt ständigen Schwankungen. Transiente Veränderungen der intestinalen Mikroflora können bei Antibiotikaeinnahme, bei Änderung der Ernährung oder Stress auftreten. Die Schwankungen sind normalerweise reversibel und der Mensch tendiert dazu eine stabile Darmflora beizubehalten (Guarner 2002). Eine intakte Darmflora ist für den Menschen deshalb von zentraler Bedeutung, weil lebenswichtige Funktionen an sie geknüpft sind: 1.) stellt sie eine mikrobielle Barriere gegen fremde Keime dar, 2.) beeinflusst sie das darmassoziierte Immunsystem, 3.) regt sie die Darmmotilität an, 4.) produziert sie lebenswichtige Vitamine und 5.) ist sie verantwortlich für die Dekonjugation von Gallensäuren, die wiederum Lysozym aktiviert und die Mikroflora in Grenzen hält (Dubach 2001).

2.3 Laktobazillen und ihre Bedeutung als Probiotika

Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts studierte Metchnikoff (1908) die Wirkung der Milchsäurebakterien auf die Mikroflora des Verdauungstraktes und kam zu dem

Schluss, dass sich eine ausgewogene Laktobazillenflora positiv auf die Darmgesundheit auswirkt und die den Darm schädigenden Mikroorganismen reduziert. Den positiven Effekt der Milchsäurebakterien auf die Gesundheit wiesen später Sarra et al. (1984), Nemcova (1997) und Strus et al. (2001) in ihren Studien nach. Letztere Autoren testeten die antimikrobielle Wirkung von Laktobazillen aus dem Verdauungstrakt gegen *Helicobacter pylori*, dem Verursacher gastroenterologischer Infektionen. Die untersuchten Stämme humanen Ursprungs waren alle in der Lage, *Helicobacter pylori* im Wachstum zu unterdrücken.

Mit wachsendem Interesse werden Laktobazillen in den letzten Jahren für die Produktion von Probiotika eingesetzt. Lilly und Stillwell (1965) beschrieben Probiotika erstmals als „...von Mikroorganismen produzierte wachstumsfördernde Faktoren“. Nach aktueller Definition gelten als Probiotika „lebende, definierte Mikroorganismen, die nach ihrem Verzehr gesundheitsfördernde Effekte ausüben, die über das Maß der Grund gegebenen physiologischen Effekte hinausgehen“. Sie können als Lebensmittelbestandteil oder in Form einer Nicht-Lebensmittelpräparation aufgenommen werden. Milchsäurebakterien sind dabei mit weitem Abstand die wichtigste Keimgruppe in Probiotika. Weitere als Probiotiker eingesetzte Mikroorganismen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Roy et al. (2000) untersuchten Laktobazillenstämme des Gastrointestinaltraktes hinsichtlich ihrer probiotischen Wirksamkeit. Arten wie *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum* und *L. salivarius* waren am häufigsten probiotisch aktiv und werden auch am häufigsten in probiotischen Produkten eingesetzt. Nach Fuller (1989) werden auch nicht intestinalen Stämmen von *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* und Kombinationen mesophiler Laktobazillen, einschließlich *L. curvatus* und *L. sake*, positive Wirkungen zugeschrieben.

Ursprünglich wurden probiotische Bakterien als Mastzusatz an Tiere verfüttert. Seit 1990 werden Probiotika in Europa für den menschlichen Verzehr angeboten und haben sich gut auf dem Markt als Beigabe in Nahrungsmitteln (z.B. Joghurts) etabliert.

Tabelle 2: In Probiotika verwendete Mikroorganismen (Herstellerbezeichnung in Klammern) (Holzapfel et al. 1997, Reuter 1997)

Laktobazillen	Bifidobakterien	Sonstige
L. acidophilus (LA7, Bactolab-Kulturen)	B. longum (BB536)	Enterococcus faecalis °
L. crispatus (L. acidoph. « Gilliland »)	B. bifidum	Enterococcus faecium
L. johnsonii (LA1, BIOGARDE- Kulturen)	B. animalis	Lactococcus lactis
L. gasseri	B. infantis	Sporolactobacillus inulinus °
L. (para)casei (L. casei „shirota“, L. casei „Actimel“)	B. adolescentis	Bacillus cereus „toyoi“ °
L. rhamnosus (L. casei GG (LGG))	B. breve	Escherichia coli (E. coli „Nissle 1997“)
L. casei		
L. reuteri		Saccharomyces boulardii °
L. plantarum		

° vorwiegend in der Tiernahrung oder in pharmazeutischen Präparaten eingesetzt

In asiatischen Ländern werden probiotische Keime schon seit Jahrzehnten als Beigabe in Nahrungsmitteln verwendet. So geht das probiotische Getränk YAKULT auf Dr. Shirota in das Jahr 1935 zurück. Der japanische Arzt und Wissenschaftler setzte das Getränk erfolgreich zur Therapie von Durchfallerkrankungen ein. Später gelang es Gorbach (1987) mit einer Laktobazille eine sehr hartnäckige, von Clostridium difficile verursachte Colitis zu behandeln. Dass die antibakterielle Wirkung auf Stoffwechselprodukte der Laktobakterien beruht, bestätigten auch die Ergebnisse von Michetti (1999), der Infektionen durch Helicobacter pylori mit der Molke aus Milch, in der L. acidophilus angezüchtet worden war, heilte.

Probiotische Mikroorganismen bewirken durch ihre Stoffwechselprodukte eine Stabilisierung mikrobiologischer Verhältnisse im Darm und tragen zum allgemeinen Wohlbefinden bei. Die dabei erzielten Effekte sind stammspezifisch und abhängig von der Art, der Zusammensetzung, der Dosis und dem physikalischen Zustand des probiotischen Lebensmittels.

Bei der Herstellung von Probiotika werden bestimmte Voraussetzungen an die Probiotiker gestellt. Sie sollten:

- 1.) natürliche Bewohner des menschlichen Gastrointestinaltraktes sein, da der Mensch mit ihnen in einem symbiotischen Verhältnis lebt und sie so am besten an das menschliche Ökosystem angepasst sind,
- 2.) resistent gegenüber Magen- und Gallensaft sein, um den Dickdarm in aktiver Form zu erreichen,
- 3.) die Möglichkeit zur Adhäsion an Darmzellen und Vermehrungsfähigkeit am Wirkort haben,
- 4.) antimikrobielle Substanzen produzieren und
- 5.) technologisch für die Nahrungsmittelproduktion geeignet sein, also nach dem technologischen Prozess lebensfähig sein. Ihr Zusatz in Lebensmitteln sollte weiterhin zu keinerlei geschmacklicher Veränderung führen.

Die Wirkung von Probiotika sind in Studien von De Vrese und Schezenmeir (1998), Persin (1998) und der Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln" am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin untersucht worden. Die von den Autoren nachgewiesenen Effekte sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die Verringerung bakterieller Enzymaktivitäten durch Laktobazillenkulturen in Milchprodukten wird der Bekämpfung von Karzinomen zu Gute geschrieben.

Conway (1988) beschrieb die biochemischen Effekte von Laktobazillen, die das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken, senken. So tragen die Metaboliten von Laktobazillen zur Senkung von β -Glukoronidase, Azoreduktase und Nitroreduktase bei. Im Tierexperiment konnte eine antimutagene Wirkung bereits nachgewiesen werden (Reddy et al. 1973, Farmer et al. 1975). Aso und Akazan (1992) zeigten, dass sich bei Mäusen das Wachstum implantierter oder chemisch induzierter Tumore nach Injektion von Joghurtkulturen und einer Reihe probiotischer Bakterienstämme hemmen lässt. So blieben nach Untersuchungen von Aso und Akazan (1992) Patienten nach operativer Entfernung eines Blasenkarzinoms unter regelmäßiger Probiotikagabe eine signifikant längere Zeit metastasenfrei.

Tabelle 3: Effekte von Probiotika

Gesicherte Effekte	Mögliche Effekte	Mögliche Risiken
Resistenz gegen Magen- und Gallensäuren	Barriereeffekt	Mögliche Stimulierung des Immunsystems bei immunsupprimierten Patienten nach Transplantationen
Immunmodulation	Senkung des Blutcholesterinspiegels, Beeinflussung des Lipidstoffwechsels	
Verkürzung der Dauer und geringere Häufigkeit von Durchfallerkrankungen	Erhöhte Resistenz gegen Infekte, Reduktion von Allergien und Autoimmunerkrankungen	
Verringerung bakterieller Enzymaktivitäten	Verhinderung von Krebsentstehung	
Senkung der Konzentration gesundheitsschädlicher Stoffwechselprodukte	Osteoporoseprävention	
Steigerung der Laktoseverträglichkeit bei Laktosemalabsorption	Steigerung des Mineralstoffwechsels	

2.4 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen

Antagonistische Beziehungen zwischen Bakterien beruhen beispielsweise auf ihrer Säureproduktion, Säuretoleranz oder der Produktion von Bacteriocinen, durch die sich Bakterien in ihrer jeweiligen ökologischen Nische gegenüber anderen Bakterien behaupten (Strus et al. 2001). Bacteriocine sind seit Pasteur (1877) bekannt. Es sind Proteine mit antibakteriellen Eigenschaften, die sich von den Antibiotika durch ein geringeres Wirkungsspektrum unterscheiden.

Gratia und Fredericq (1946) führten Untersuchungen an Enterobakterien durch und isolierten eine Proteinklasse, die für die inhibierende Wirkung auf das Bakterienwachstum von *Escherichia coli* verantwortlich war. Die Autoren schlugen für die isolierten Substanzen den Terminus „Colicin“ vor. Jakob (1958) prägte später den allgemeinen Begriff „Bacteriocin“ für antibakterielle Proteine bakteriellen Ursprungs, da sie nachfolgend auch bei nicht coliformen Stämmen gefunden wurden. Bacteriocine oder Bacteriocin ähnliche Substanzen grampositiver Bakterien unterscheiden sich von denen der Gramnegativen. Das Wirkspektrum grampositiver Bakterien ist breiter und

richtet sich gegen unterschiedlichste grampositive Arten. Dagegen besitzen die Bacteriocine gramnegativer Bakterien ein enges Wirkspektrum. Sie beeinflussen nur Stämme innerhalb der Bakterienart von der sie gebildet wurden (Brandis 1975). Beispiele einiger grampositiver und gramnegativer bacteriocinogener Bakterienstämme und deren Bacteriocin sind in Tabelle 4 aufgeführt. Von ökonomischer Bedeutung ist zum Beispiel das Bacteriocin Nisin A, das von Milchsäurebakterien freigesetzt wird. Nisin A hemmt ein breites Spektrum grampositiver Bakterien und wird deshalb in Lebensmitteln zur Konservierung eingesetzt (Brock et al. 2001).

Tabelle 4: Beispiele medizinisch bedeutsamer grampositiver und gramnegativer bacteriocinogener Bakterienarten und deren Bacteriocine

Bakterienart	Bezeichnung des Bacteriocins
<i>Gramnegative Bakterien</i>	
Escherichia coli	Colicin
Shigella	Colicin
Enterobacter cloacae	Aerocin
Yersinia pestis	Pesticin
Pseudomonas aeruginosa	Pyocin
Vibrio cholera	Vibriocin
<i>Grampositive Bakterien</i>	
Staphylococcus aureus	Staphylococcin
Streptococcus viridans	Enterocin
Bacillus megatericum	Megacin
Clostridium botulinum	Boticin
Streptococcus mutans	Mutacin

Die Fähigkeit der Bacteriocinproduktion ist auf dem Plasmidring oder Transposonen kodiert (Bennett und Richmond 1978, Brock et al. 2001, Fritsche und Laplace 2002). Plasmide sind kleine zirkuläre doppelsträngige, extrachromosomale DNA-Moleküle, die genetische Informationen für bis zu 30 und mehr Gene tragen. Ein bis fünf Prozent der genetischen Informationen der Zelle können in Plasmiden vorliegen.

Plasmide existieren unabhängig vom bakteriellen Chromosom und werden autonom repliziert (Fritsche und Laplace 2002). Transposonen sind kleine Segmente auf der DNA, die von einer Region zu einer anderen Region auf dem DNA-Molekül versetzt („be transposed“) werden können. Diese kleinen Abschnitte auf der DNA können eine Länge von 700 bis zu 40.000 Basenpaaren besitzen (Tortora et al. 2002).

Nicht alle Bakterien besitzen Plasmide, sie können aber mittels Konjugation von einer Zelle auf eine andere (auch zwischen verschiedenen Spezies) übertragen werden (Mortvedt und Nes 1990, Brock et al. 2001). Unter den Plasmidgruppen befinden sich auch Resistenzplasmide, die Resistenz gegen Antibiotika und andere Wachstumsinhibitoren verleihen. So sind die bacteriocinproduzierenden Stämme gegen ihr eigenes Bacteriocin immun (Brock et al. 2001). Nach Ocana und Nader Macias (2004) werden Bacteriocine als proteinartige, von Bakterien synthetisierte bakterizide Substanzen definiert, die normalerweise ein enges Spektrum an Aktivität aufweisen, indem sie entweder nur Stämme der gleichen oder eng verwandten Art hemmen. Der Ausdruck „Bacteriocin ähnliche Substanz“ wird auf antagonistische Substanzen angewandt, die nicht vollständig definiert sind oder nicht über die typischen Charakteristika der Bacteriocine verfügen. Bacteriocin ähnliche Substanzen können sowohl ein breites Spektrum von grampositiven als auch gramnegativen Bakterien hemmen und ebenso Pilze. Wie alle Proteine werden Bacteriocine von Ribosomen produziert und anschließend modifiziert. Dies geschieht durch Kettenspaltung und enzymatische Umwandlung üblicher Aminosäuren in ungewöhnliche, im genetischen Code nicht vorkommende Aminosäuren, die in Proteinen ansonsten sehr selten vorkommen (Montville und Kaiser 1993).

Zur Wirkungsentfaltung eines Bacteriocins müssen an der Empfängerzelle Rezeptoren für die Bindung des Bacteriocins zur Verfügung stehen. Nach Nomura (1964) werden zwei Angriffspunkte für Bacteriocine unterschieden. Als biochemisches Target wird der Wirkort in der Zelle bezeichnet, an dem eine biochemische Veränderung erfolgt. Ein tödliches Target liegt bei letaler Wirkung des Bacteriocins vor. An der Angriffszelle können Bacteriocine bakteriostatische, bakterizide oder bakteriolytische Reaktionen auslösen (Brandis und Smarda 1971). Dabei spielen unterschiedliche Mechanismen eine Rolle. So kann 1.) die DNA der Bakterienzelle nicht mehr synthetisiert werden, 2.) kann die 16S-RNA der 30S-Einheit des Ribosoms gespalten werden und in der Folge wird die Proteinsynthese gehemmt und 3.) können über Interaktion des Bacteriocins mit der

Zellmembran Funktionen wie z.B. der Energiestoffwechsel gestört werden (Tagg et al. 1976).

Während die Stoffwechselprodukte mancher Bakterien pathogen sind, sind die von Laktobazillen produzierten Proteine für den Menschen positiv; sie wirken gegen andere, möglicherweise pathogene Mikroorganismen antimikrobiell, sind über diese antimikrobielle Wirkung hinaus nützlich und schaden dem Menschen nicht. Bacteriocin produzierende Starterkulturen dienen auch dazu, eine zuverlässige Fermentation zu gewährleisten und das Wachstum von Verderborganismen zu verhindern. Nach Mortvedt und Nes (1990) würde es sich anbieten, den genetisch ausschlaggebenden Faktor zur Bacteriocinproduktion als genetischen Marker in der DNA-Technologie einzusetzen.

Die antimikrobielle Wirkung der Laktobazillen wurde allerdings nicht nur in ihren Bacteriocinen gesehen, sondern auch in der Bildung von Wasserstoffsuperoxid aus toxischen Metaboliten von Sauerstoff und in der Milchsäureproduktion (Nemcova 1997, Wood 1985). Wasserstoffsuperoxid wirkt auf die meisten Krankheitserreger bakterizid. Die Produktion von organischen Säuren durch Laktobazillen ist demgegenüber Hauptregulator der mikrobiellen Aktivität im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier (Nemcova 1997).

Bereits in den 50er Jahren wurde auch bei den Laktobazillen von antagonistischen Aktivitäten berichtet. Wheeler et al. (1951) beschrieben „Antibiotika ähnliche Substanzen“ bei Laktobazillen und bezeichneten sie als „Lactobacillin“. Vincent et al. (1959) beschrieben einen bacteriocinähnlichen Hemmstoff, der durch Kulturen von *L. acidophilus* auf Kalbsleberagar produziert wurde. Sabine (1963) untersuchte eine Substanz, die von *L. acidophilus* produziert wurde und konnte eine Wachstumshemmung von Staphylokokken demonstrieren. Silva et al. (1987) erkannten die antibiotische Aktivität des Stammes *Lactobacillus spec. GG*. Die Laktobazille hemmte anaerobe Bakterien und Enterobakterien, Pseudomonaden, Staphylokokken und Streptokokken, aber keine Laktobazillen. Die gewonnene Substanz war hitzestabil und unsensibel gegenüber verschiedener Proteasen. Mit diesen Eigenschaften zusammen mit einem niedrigen Molekulargewicht von $< 1,000$ Da lag kein Bacteriocin, sondern ein sogenanntes Microcin vor.

De Klerk (1967) untersuchte die heterofermentative Laktobazille *L. fermentum* hinsichtlich der Bacteriocinproduktion. Der Autor konnte eine Wachstumsinhibierung eng verwandter Arten aufzeigen. Gegenüber homofermentativen

Laktobazillenstämmen - beispielsweise *L. acidophilus* - erwies sich *L. fermentum* als bacteriocinogen.

Barefoot and Klaenhammer (1983,1984) beschrieben das „Lactacin B“, das von *L. acidophilus* produziert wurde und gegen *L. leichmanii*, *L. helveticus*, *L. lactis* und *L. bulgaricus* aktiv war. Beim „Lactacin B“ mit einem Molekulargewicht von 6,000 bis 6,500 Da handelte es sich um ein Bacteriocin. Nach Ausschluss der antibakteriellen Wirkung von organischen Säuren und Hydrogenperoxid konnte jedoch keine Hemmung anderer grampositiver oder gramnegativer Bakterienarten nachgewiesen werden; es beschränkte sich streng auf die Laktobazillen selbst. In neueren Untersuchungen isolierten Zamfir et al. (1999) das „Acidophillin 801“, ein kleines Bacteriocin mit weniger als 6,5 kDa aus Kulturen von *L. acidophilus* IBB 801. Das kleine Bacteriocin hatte ein enges Wirkspektrum gegen nahe verwandte Laktobazillen und gegen die gramnegativen Pathogene *E. coli* row und *Salmonella panama* 1467.

Upreti und Hindsdill (1973) beschrieben das Bacteriocin „Lactocin 27“ von *L. helveticus* LP27, das in einem engen Wirkspektrum nur Stämme von *L. acidophilus* und *L. helveticus* einschloss. Das Bacteriocin „Helviticin J“ wurde nachfolgend von Joerger und Klaenhammer (1986) bei *L. helveticus* beschrieben. Sein Hemmspektrum richtet sich gegen nah verwandte Spezies, einschließlich *L. helveticus* 1846 und 1244, *L. bulgaricus* 1373 und 1489 und *L. lactis* 970. Bonade et al. (2001) konnten weiterführend zeigen, dass die bacteriocinogene Wirkung von *L. helveticus* auch gegen thermophile Laktobazillenstämme gerichtet war, das Bacteriocin ein Molekulargewicht von 12,5 kDa hatte, hitzestabil und bakterizid war und durch proteolytische Enzyme inaktiviert werden konnte.

Mortvedt und Nes (1990) isolierten das „Lactocin S“, das von *L. sake* L45 - gebunden an das Plasmid pCIM1 - produziert wurde und das Wachstum von Laktobazillen, Pediokokken und *Leuconostoc* hemmte.

Die vorliegende Untersuchung widmete sich wiederum der Bacteriocinbildung und -sensibilität von Laktobazillen unter dem Blickwinkel der oralen Mikrobiologie.

2 Einleitung

Der menschliche Körper ist der Lebensraum für eine Vielzahl von Bakterien, die für den menschlichen Körper gleichzeitig essentiell sind. Die Bakterien besiedeln unmittelbar nach der Geburt die inneren und äußeren Körperoberflächen und vermehren sich dort. Der Mensch selbst zählt etwa eine Milliarde körpereigener Zellen; im Kontrast dazu beherbergt der Darm allein schon 100 Milliarden Mikroorganismen. So sind auch Bakterienzellen - gemessen an den körpereigenen Zellen des Menschen - in der Überzahl. Nur ein geringer Teil der Mikroorganismen ist humanpathogen; der größere Teil lebt mit dem menschlichen Körper in einer Symbiose. So sind einige Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen für den Menschen von Vorteil und teilweise essentiell. Mit Hilfe der Darmbakterien wird beispielsweise die Vitamin-K-Verfügbarkeit gesichert. Die mikrobiellen Kommensalen des Menschen sind darüber hinaus physiologisch wichtig, weil sie als „Platzhalter“ die Etablierung potentiell schädlicher Mikroorganismen verhindern. Bakterien bilden aber auch Antibiotika oder Proteine mit antibiotischer Wirkung, die Bacteriocine, die konkurrierenden und pathogenen Bakterien das Überleben erschweren.

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Identifizierung oraler Laktobazillen und ihrer potentiellen Bacteriocinogenität auseinander. Laktobazillen sind grampositive, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien aus der Familie der Lactobacteriaceae, die zu den Milchsäurebakterien zählen. Sie sind unbeweglich, bilden keine Katalase und sind im Allgemeinen nicht in der Lage Nitrate zu Nitrit abzubauen (Kandler und Weiss 1986). Laktobazillen sind zur Energiegewinnung auf Kohlenhydrate angewiesen und werden je nach Verstoffwechslung von Glukose in homofermentative oder heterofermentative Arten eingeteilt. Die heute mehr als 50 bekannten Arten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zum Überleben und Vermehren benötigen sie neben den Kohlenhydraten Aminosäuren, Peptide, Fettsäuren, Fettsäureester und eine Reihe von Vitaminen (zum Beispiel Vitamin B12) (Sharpae 1981). Laktobazillen sind aerotolerante Anaerobier. Sie sind säuretolerant und verursachen niedrige pH-Werte im umgebenden Milieu, in dem viele andere anaerobe Bakterien nicht mehr überleben können.

Tabelle 1: Homo- und heterofermentative Laktobazillen – eine Übersicht

Heterofermentative Laktobazillenarten		Homofermentative Laktobazillenarten
obligat	fakultativ	
L. bifermentans	L. agilis	L. acidophilus
L. brevis	L. alimentarius	L. amylophilus
L. buchneri	L. bavaricus	L. amylovorus
L. collinoides	L. casei ss casei	L. animalis
L. cellobiosus	L. casei ss pseudopantarum	L. casei
L. divergens	L. casei ss tolerans	L. catenaformis
L. fermentum	L. coryniformis ss coryniformis	L. crispatus
L. fructivorans	L. coryniformis ss torques	L. delbrueckii ss delbrueckii
L. fructosus	L. curvatus	L. delbrueckii ss lactis
L. heterohiochii	L. graminis	L. delbrueckii ss bulgaricus (L. bulgaricus)
L. hilgardii	L. homohiochii	L. farciminis
L. kandleri	L. maltaromicus	L. gasseri
L. kefir	L. murinus	L. helveticus
L. malefermentans	L. plantarum	L. jensenii
L. reuteri		L. leichmannii
L. sanfranciscensis		L. paracasei ss paracasei
L. suebicus		L. paracasei ss tolerans
L. trichodes		L. pentosus
L. vaccinofermentans		L. rhamnosus
		L. ruminis
		L. salivarius (L. salivarius ss salicinus und
		L. salivarius ss salivarius)
		L. sharpae
		L. vitulinus
		L. xylosus
		L. yamashiensis

3 Zielstellung

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit bestand darin zu prüfen, ob orale Laktobazillen chemotaxonomisch mit Hilfe ihres Membranfettsäurespektrums voneinander abgegrenzt werden können.

Im internationalen Schrifttum zu oral-mikrobiologischen und zahnheilkundlichen Fragestellungen werden Laktobazillen gewöhnlich auf dem synthetischen und selektiven Rogosaagar ohne nachfolgende Differenzierung bestimmt. Deshalb sollte geprüft werden, ob das Membranfettsäurespektrum der Laktobazillen ein stabiles Merkmal ist, das sich eignet, orale Arten sicher voneinander abzugrenzen oder nicht. Zur Prüfung standen 20 Referenzstämme der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) zur Verfügung. Die chemotaxonomische Identifizierung der Stämme sollte mit dem Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA), das über eine Datenbank von 91 Laktobazillenarten verfügt, erfolgen.

Inwieweit orale Laktobazillen auch zur Bacteriocinproduktion befähigt sind und damit ihre Virulenz steigern, war ein weiteres Anliegen der vorliegenden Studie. So sollten zunächst die 20 Referenzstämme der DSMZ hinsichtlich ihrer Bacteriocinogenität untersucht werden. Dabei sollte die Sensibilität von Mutans-Streptokokken (*S. mutans*, *S. sobrinus*) und oralen Streptokokken (*S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* und *S. salivarius*) erfasst werden.

Mit den Teilstudien sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Wie effizient ist das Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) zur chemotaxonomischen Identifizierung von Laktobazillen und insbesondere von oralen Laktobazillen?
- Ist eine 24stündige Anzucht der Laktobazillen zur Sicherung des Taxons einer 48stündigen Anzucht überlegen oder sind beide gleichwertig?
- Sind Laktobazillen - insbesondere orale Laktobazillen - mehrheitlich bacteriocinogen?
- Sind aufgefundene Bacteriocinprofile artspezifisch?
- Bestehen Unterschiede in der Sensitivität von Mutans- und oralen Streptokokken gegenüber bacteriocinogenen Laktobazillen?
- Könnte Bacteriocinprofilen von Laktobazillen eine ökologische Bedeutung in der Mundhöhle zukommen?

Als Hypothesen wurden angenommen, dass

- das Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) zur chemotaxonomischen Identifizierung von Laktobazillen und insbesondere von oralen Laktobazillen geeignet ist.
- eine 24stündige Anzucht der Laktobazillen zur Sicherung des Taxons der 48stündigen Anzucht überlegen ist.
- Laktobazillen - insbesondere orale Laktobazillen - mehrheitlich nicht bacteriocinogen sind.
- die Bacteriocinprofile der Laktobazillen artspezifisch sind.
- Unterschiede in der Sensitivität von Mutans- und oralen Streptokokken gegenüber Laktobazillen bestehen und dass
- Bacteriocinprofile von Laktobazillen eine ökologische Bedeutung in der Mundhöhle haben können.

4 Material und Methoden

4.1 Methodisches Vorgehen zur chemotaxonomischen Identifizierung oraler Laktobazillen mittels Membranfettsäurespektrum

Für die Untersuchungen wurden 20 Referenzstämme von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) herangezogen (Tab. 5).

Tabelle 5: Referenzstämme von Laktobazillen

Stamm-Nummer	Taxon
DSMZ 20001	<i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i>
DSMZ 20004	<i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>
DSMZ 20008	<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>
DSMZ 20011	<i>L. casei</i>
DSMZ 20012	<i>L. paracasei</i> ss <i>tolerans</i>
DSMZ 20016	<i>L. reuteri</i>
DSMZ 20021	<i>L. rhamnosus</i> (<i>L. casei</i> ss <i>rhamnosus</i>)
DSMZ 20022	<i>L. rhamnosus</i>
DSMZ 20054	<i>L. brevis</i>
DSMZ 20057	<i>L. buchneri</i>
DSMZ 20072	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i>
DSMZ 20074	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>delbrueckii</i>
DSMZ 20077	<i>L. gasseri</i>
DSMZ 20079	<i>L. acidophilus</i>
DSMZ 20080	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i>
DSMZ 20181	<i>L. alimentarius</i>
DSMZ 20187	<i>L. zeae</i>
DSMZ 20555	<i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>
DSMZ 2601	<i>L. plantarum</i>
DSMZ 5457	<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>

Die Stämme wurden bei -18°C in MicrobanksTM (Pro-LAB, Ontario, Kanada) konserviert und gehalten. Zur Reaktivierung der Stämme wurden 3 - 4 Keramikperlen mit einer sterilen Impföse in Peptone-Yeast-Extrakt-Tween-80-Bouillon (PYGT, Moore 1994), dem Standardmedium für das MIDI-System, gegeben. Pro Stamm wurden 3 Kulturröhrchen mit je 10 ml PYGT angeimpft und anaerob (GasPak, BBL) bei 35 ± 2°C 24 und 48 Stunden bebrütet.

Die Inkubationszeiten wurden mit einer maximalen Abweichung von $\pm 0,5$ Stunden eingehalten; die Kulturen wurden im Grampräparat auf ihre Reinheit kontrolliert. Die Kulturansätze wurden nach der Bebrütung vereinigt und 5 min bei 4000 U/min (Megafuge 1.0 Sepatech, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach Waschen mit einer 0,5%igen Magnesiumsulfatlösung erneut 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Bei dem nachfolgenden Schritt der *Verseifung* wurden die sedimentierten Bakterien aufgeschlossen und die Membranfettsäuren freigesetzt. Das Bakteriensediment wurde dazu mit 1 ml der Reagenz I (Anhang) versetzt und 5 - 10 sec mit dem Vortex-Schüttler (Vibrofix VF1, Electronic) geschüttelt. Nach 5minütiger Temperierung in einem Wasserbad bei $100 \pm 0^\circ\text{C}$ wurde der Ansatz geschüttelt und erneut 25 min im Wasserbad bei $100 \pm 0^\circ\text{C}$ gehalten.

Nach Abkühlen erfolgte die *Methylierung*, wobei aus den Fettsäuren Methylester gebildet werden. Durch die Zugabe von je 1 ml der Reagenzien IIa und IIb (Anhang) wurde der Tween-80-Zusatz als Störfaktor ausgeschlossen. Nach 5 - 10 sec Schütteln wurden die Reaktionsgefäße anschließend 10 min in einem 80°C warmen Wasserbad temperiert. Die Methylierung wurde durch schnelles Abkühlen beendet.

Bei dem sich anschließenden Schritt der *Extraktion* werden die Fettsäuremethylester von der wässrigen in die organische Phase überführt. 1,25 ml Reagenz III (Anhang) wurden in die mit Schraubverschluss versehenen Reaktionsgefäße zugegeben und „über Kopf“ geschüttelt (Kopfschüttler Typ Reax 2, Heidolph). Die extrahierten Fettsäuren befinden sich nun im Überstand und werden im nächsten Schritt der *Waschung* mit 3 ml des Reagenz IV (Anhang) gewaschen. Nach 5minütigem „über Kopf“ Schütteln wurde die obere (organische) Phase mit Hilfe einer Pasteurpipette in das Probengefäß für den Gaschromatograph (GC) überführt und mit einer Spezialkappe verschlossen. Nach diesen Arbeitsschritten ist die Probe, wenn keine unmittelbare Analyse erfolgt, bei einer Lagerung von $+4^\circ\text{C}$ über 2 Monate haltbar.

Die Untersuchung des Membranfettsäurespektrums der 20 Referenzstämme erfolgte einmal nach 24- und einmal nach 48stündiger anaerober (GasPak, BBL) Bebrütung bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$. 10fach-Bestimmungen wurden vorgenommen. Zur Identifikation einer Probe benötigt der Gaschromatograph 30 min; ca. 200 Stammproben können hintereinander analysiert werden. Vor der Analyse wird das Gerät geeicht. Es erfolgt zunächst eine Reinigung der Trennsäule mittels N-Hexan (Merck AG) bis zum Erreichen des Null-Wertes. Anschließend erfolgt die Kalibrierung mit Standard Kits (Fatty acid methyl Esters in Hexane: 0025-02% W/V, Hewlett Packard), die während des

Probendurchlaufes nach jeder 11. Analyse wiederholt wird. Zwei Indizes, der „Similarity Index“ (SI) und die „Euklid Distanz“ (ED), werden zur Qualitätskontrolle herangezogen. Dabei liegt eine große Übereinstimmung des gesuchten Stammes mit den in der Datenbank hinterlegten Mikroorganismen vor, wenn der SI zwischen 0.6 und 1.0 und der ED bei $2 \leq 6$ liegt. Dem Nutzer werden nach Vergleich des Membranfettsäurespektrums des zu identifizierenden Stammes mit den Bibliotheksdaten drei bis fünf Taxa zur Entscheidungsfindung angeboten. Das angebotene Taxon mit der niedrigsten ED und dem höchsten SI wird als wahrscheinlichstes Ergebnis vorgeschlagen.

4.2 Untersuchungen zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen

Bakterienstämme: Die in Tabelle 5 aufgelisteten Laktobazillenstämme wurden als Teststämme in die Untersuchungen einbezogen. Als Indikatorstämme wurden Stämme von *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* und *S. salivarius* ausgewählt (Tab. 6).

Tabelle 6: In die Untersuchung einbezogene Indikatorstämme

Taxon	Stamm
S. mutans (c)*	NCTC ¹ 10449, Ingbritt ⁴ ,
S. mutans (e)*	LM 7 ⁵ , V 100 ⁵
S. mutans (f)*	QP 50-1 ⁵ , SE 11 ³
S. sobrinus (d)*	OMZ 176 ³
S. sobrinus (g)*	OMZ 65 ⁵
S. sanguis	OMZ 9S ³ , HG 1473 ²
S. oralis	HG 1290 ² , HG 1601 ²
S. mitis	OMZ 8 ⁵
S. gordonii	HG 295 ²
S. salivarius	OMZ 47 ⁵

¹ National Collection of Type Cultures, London, UK, ² Academic Centre for Dentistry Amsterdam, Dept. of Oral Microbiology, J.J. de Soet, Ph.D., ³ Dept. of Oral Microbiology and General Immunology, Dental Institute, Zürich, Schweiz, Prof. B. Guggenheim, ⁴ Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena, Deutschland, Prof. W. Köhler, ⁵ Caries Prevention and Research, Branch, National Caries Program, National Institute of Dental Research, NJH, Prof. W. H. Bowen, ⁶ Department of Oral Microbiology, University of Umeo, Schweden, Prof. J. Carlsson, ⁷ King's College, School of Medicine and Dentistry, London, UK, Prof. D. Beighton

() * in Klammern Serotyp

Die Haltung und Reaktivierung der Test- und Indikatorstämme erfolgte wie zuvor in Kapitel 4.1 beschrieben.

4.2.1 Methodisches Vorgehen zur Testung der Bacteriocinproduktion

Teststämme: Die Stämme wurden in Kulturröhrchen mit 10 ml Rogosabouillon verimpft und 24 Stunden bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ anaerob (GasPak System, BBL) bebrütet.

Mit Kulturen von jeweils 9 Stämmen wurden unter aseptischen Bedingungen in der Werkbank (Heraeus Lamin Air, HBB 2448, Hanau, Deutschland) mit einer Eppendorfpipette (Plastomat, Deutschland, 10 nl) in einem bestimmten Raster (Abb. 1) Makrokolonien auf Petrischalen mit 20 ml Basisagar (Trypticase-Soja-Bouillon, BBL mit 2%igem Agarzusatz, Difco) verimpft.

Die Petrischalen wurden zuvor in waagerechter Lage mit dem Agargießgerät (Tecnomat 125, Integra Biosciences GmbH, Wallisellen, Schweiz) mit je 20 ml Basisagar beschickt.

Die verimpften Teststämme wurden anschließend für 48 Stunden unter anaeroben Bedingungen bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ im Anaerobierbrutschrank (Instruments VT 5042EK/N2) inkubiert.

Von den Makrokolonien wurden 100 mittels Stechzirkel und Lineal ausgemessen, um ihren mittleren Durchmesser zu bestimmen. Der mittlere Durchmesser lag bei $8,1 \pm 0,1$ mm.

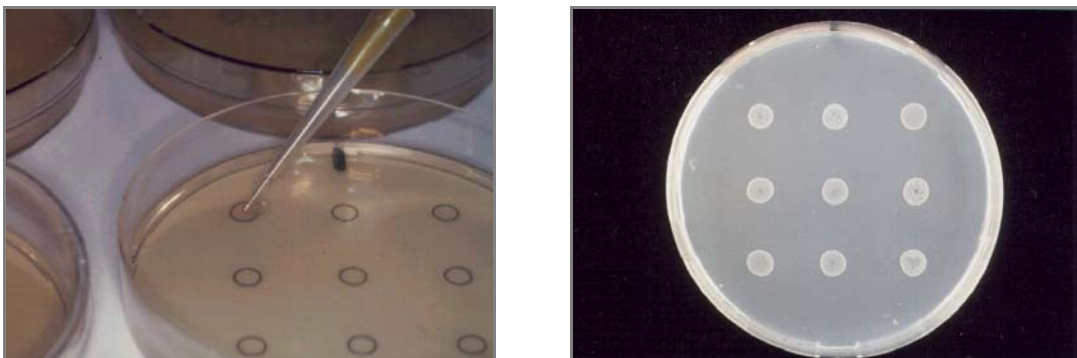


Abbildung 1: Verimpfen der Kulturen (links) und Makrokolonien nach Inkubation (rechts)

Indikatorstämme: 0,5 ml von 48-Stunden-Kulturen der Indikatorstämme wurden in 10 ml autoklavierten und auf etwa 50°C abgekühlten Deckschichtagar (Trypticase-Soja-Bouillon, BBL mit 0,8%igem Agarzusatz, Difco) gemischt (Vibrofix Typ VF 1

Electronic, IKA-Elektronics) und auf den Basisagar mit den Makrokolonien aufgebracht. Dabei wurde der Agar vorsichtig vom Rand der Petrischale aus auf den Basisagar gegossen, um ein Abschwemmen der Makrokolonien zu vermeiden.

Nach Erstarren der Deckschicht wurden die Petrischalen für eine Stunde im Kühlschrank (Vitacool 130, Foron, Deutschland) bei 4 - 8°C gelagert, um eine Diffusion der gebildeten Bacteriocine in den Deckschichtagar zu fördern. Anschließend wurden die Petrischalen für 48 Stunden bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ im Anaerobierbrutschrank bebrütet. Eine 48stündige Bebrütungszeit erwies sich im Vergleich zu einer 24stündigen bereits bei anderen Untersuchungen als günstiger. Nach Scharff (2004) sind im Bakterienrasen die Ränder der Hemmhöfe nach 48 Stunden Bebrütung schärfer ausgebildet.

4.2.2 Evaluierung der Hemmhöfe

Der Durchmesser der Hemmhöfe wurde mittels Stechzirkel und Lineal ermittelt. Der mittlere Durchmesser von 100 Makrokolonien wurde mit $8,1 \pm 0,1$ mm bestimmt. Als bacteriocinogen wurde ein Stamm bewertet, wenn er zu einer Hemmhofgröße von ≥ 10 mm im Bakterienrasen des Indikatorstammes führte (Abb. 2).

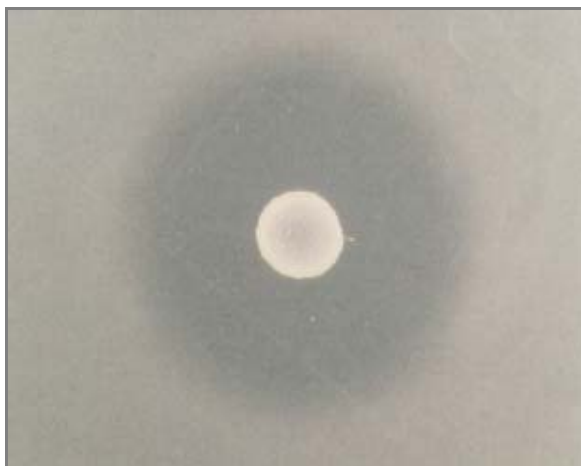


Abbildung 2: Bacteriocinogenität bei einem Hemmhof ≥ 10 mm um die Makrokolonie

5 Ergebnisse

5.1 Zur chemotaxonomischen Identifizierung der Referenzstämmen

Ziel der Untersuchungen war es, mit Referenzstämmen von Laktobazillen (DSMZ, Braunschweig) das MIDI-System hinsichtlich seiner Eignung zur chemotaxonomischen Identifizierung von Laktobazillen zu prüfen. Die Stämme wurden zuvor von Wicht (persönliche Mitteilung) durch DNA-Sequenzierung in ihrer Nomenklatur bestätigt. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um 10fach-Bestimmungen nach jeweils 24- und 48stündiger Anzucht der zu untersuchenden Stämme in Yeast-Extrakt-Tween-80-Bouillon bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ unter anaeroben Bedingungen.

Pro Identifizierungsdurchlauf werden dem Nutzer drei bis fünf verschiedene, mögliche Taxa zur Auswahl angeboten. In Tabelle 7 sind bei nicht korrekt identifizierten Stämmen die am häufigsten vorgeschlagenen Taxa in einer zusammenfassenden Übersicht dargestellt; bei korrekt identifizierten Stämmen ist die Anzahl der Übereinstimmungen angegeben.

Abbildung 3 veranschaulicht, dass 4 Stämme (*L. coryniformis* ss *torquens*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. reuteri*, *L. paracasei* ss *paracasei*) sowohl nach 24- als auch nach 48stündiger Anzucht bestätigt wurden; ein weiterer Stamm (*L. buchneri*) wurde nach 24stündiger und zwei weitere (*L. brevis*, *L. acidophilus*) nach 48stündiger Anzucht chemotaxonomisch bestätigt.

Insgesamt 7 Stämme (*L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* [*L. casei* ss *rhamnosus*], *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. zeae*, *L. alimentarius*) wurden nach beiden Anzuchtverfahren zwar nicht in Übereinstimmung zur DSMZ eingeordnet, wohl aber gleich als andere Art (Tab. 8). Bei 6 Stämmen (*L. paracasei* ss *tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* ss *delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*) stimmte die Identifizierung nicht mit der der DSMZ überein. Letztlich wurde nur ein Drittel der Stämme erwartungsgemäß identifiziert.

Tabelle 7: Befunde zur chemotaxonomischen Identifizierung der Referenzstämme der Laktobazillen mit dem Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) (* korrekt identifiziert)

Referenzstamm	MIDI-Befund	
	24stündige Bebrütung	48stündige Bebrütung
DSMZ 20001 L. coryniformis ss coryniformis	10 x L. reuteri	10 x L. paracasei ss paracasei 9 x L. reuteri
*DSMZ 20004 L. coryniformis ss torquens	10 x L. coryniformis ss torquens	10 x L. coryniformis ss torquens
*DSMZ 20008 L. paracasei ss paracasei	10 x L. paracasei ss paracasei	10 x L. paracasei ss paracasei
DSMZ 20011 L. casei	10 x L. buchneri	10 x L. buchneri
DSMZ 20012 L. paracasei ss tolerans	Fehldurchlauf- zu niedrig konzentriert	9 x L. brevis 9 x L. kefir
*DSMZ 20016 L. reuteri (L. fermentum)	10 x L. reuteri	7 x L. reuteri
DSMZ 20021 L. rhamnosus (L. casei ss rhamnosus)	10 x L. plantarum	10 x L. plantarum
*DSMZ 20022 L. rhamnosus	10 x L. plantarum	2 x L. rhamnosus
*DSMZ 20054 L. brevis	3 x L. brevis	9 x L. brevis
*DSMZ 20057 L. buchneri	10 x L. buchneri	10 x L. mali
DSMZ 20072 L. delbrueckii ss lactis	10 x L. reuteri 10 x L. fermentum	10 x L. reuteri
DSMZ 20074 L. delbrueckii ss delbrueckii	9 x Streptococcus SM4	10 x Streptococcus SM4

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 7: Befunde zur chemotaxonomischen Identifizierung der Referenzstämme der Laktobazillen mit dem Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) (* korrekt identifiziert)

Referenzstamm	MIDI-Befund	
	24stündige Bebrütung	48stündige Bebrütung
*DSMZ 20077 L. gasseri	3 x L. gasseri Fehldurchlauf	2 x L. gasseri
*DSMZ 20079 L. acidophilus	9 x L. bifermentans	8 x L. acidophilus
DSMZ 20080 L. delbrueckii ss bulgaricus	10 x L. sharpeae	9 x L. sharpeae 10 x L. confusus
DSMZ 20181 L. alimentarius	9 x L. coryniformis ss torquens	10 x L. coryniformis ss torquens
DSMZ 20187 L. zeae (L.casei ss rhamnosus)	10 x L. paracasei ss paracasei 10 x Clostridium sordelli	10 x Clostridium bifermentans 9 x L. paracasei ss paracasei
DSMZ 20555 L. salivarius ss salivarius	9 x L. lactis	9 x L. lactis 10 x L. rhamnosus
DSMZ 2601 L. plantarum	10 x L. coyniformis ss torquens	9 x L. buchneri 8 x Clostridium sordelli
*DSMZ 5457 L. paracasei ss paracasei	10 x L. paracasei ss paracasei	10 x L. paracasei ss paracasei

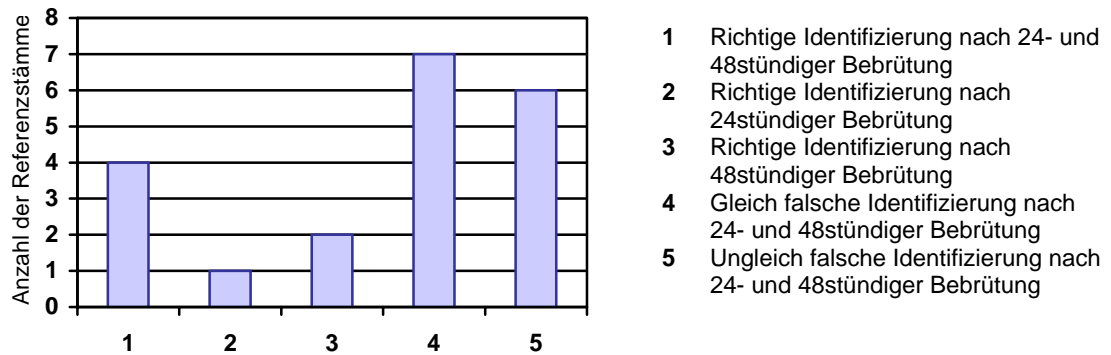


Abbildung 3: Übersicht zur chemotaxonomischen Identifizierung der Referenzstämme von Laktobazillen

Tabelle 8: Übereinstimmende Befunde zur chemotaxonomischen Identifizierung der Referenzstämme der Laktobazillen mit dem Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) nach 24- und 48stündiger Bebrütungszeit

Referenzstamm	MIDI-Befund	
	24stündige Bebrütung	48stündige Bebrütung
DSMZ 20001 L. coryniformis ss coryniformis	10 x L. reuteri	9 x L. reuteri
DSMZ 20011 L. casei	10 x L. buchneri	10 x L. buchneri
DSMZ 20021 L. rhamnosus (L. casei ss rhamnosus)	10 x L. plantarum	10 x L. plantarum
DSMZ 20072 L. delbrueckii ss lactis	10 x L. reuteri	10 x L. reuteri
DSMZ 20080 L. delbrueckii ss bulgaricus	10 x L. sharpeae	9 x L. sharpeae
DSMZ 20181 L. alimentarius	9 x L. coryniformis ss torquens	10 x L. coryniformis ss torquens
DSMZ 20187 L. zeae	10 x L. paracasei ss paracasei	9 x L. paracasei ss paracasei

5.1.1 Auswertung der Qualitätskriterien „Similarity Index“ und „Euklid Distanz“

Zur chemotaxonomischen Identifizierung der Laktobazillen werden dem Nutzer zwei Qualitätskriterien, der „Similarity Index“ und die „Euklid Distanz“, angeboten. Sowohl die Mittelwerte als auch die Standardabweichungen beider Indizes wurden für die 10fach-Bestimmungen der 20 Teststämme sowohl nach 24- als auch nach 48stündiger Anzucht berechnet und sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD) des Similarity Index (SI) und der Euklid Distanz (ED) der 20 Referenzstämme (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig DSMZ) nach 24- und 48stündiger Bebrütung

Stamm- Nummer	SI 24 Stunden	SI 48 Stunden	ED 24 Stunden	ED 48 Stunden
DSMZ 20001	0,418 ± 0,236	0,666 ± 0,139	4,44 ± 0,68	3,38 ± 0,89
DSMZ 20004	0,761 ± 0,058	0,617 ± 0,292	2,76 ± 0,42	4,24 ± 3,37
DSMZ 20008	0,623 ± 0,022	0,722 ± 0,03	3,66 ± 0,12	3,05 ± 0,25
DSMZ 20011	0,082 ± 0,160	0,181 ± 0,205	8,32 ± 1,48	7,41 ± 1,82
DSMZ 20012	0,265 ± 0,136	0,585 ± 0,142	6,57 ± 1,93	3,88 ± 1,01
DSMZ 20016	0,093 ± 0,162	0,319 ± 0,160	7,50 ± 1,83	6,38 ± 2,19
DSMZ 20021	0,144 ± 0,202	0,461 ± 0,121	7,66 ± 1,85	4,74 ± 0,89
DSMZ 20022	0,461 ± 0,129	0,283 ± 0,082	4,76 ± 0,89	6,06 ± 0,69
DSMZ 20054		0,169 ± 0,082		7,31 ± 0,99
DSMZ 20057	0,067 ± 0,213		12,1 ± 3,59	
DSMZ 20072	0,375 ± 0,022	0,333 ± 0,059	5,29 ± 0,16	5,61 ± 0,51
DSMZ 20074	0,783 ± 0,066	0,667 ± 0,104	2,62 ± 0,43	3,37 ± 0,66
DSMZ 20077	0,697 ± 0,192	0,457 ± 0,268	3,18 ± 1,28	4,94 ± 1,97

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 9: Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD) des Similarity Index (SI) und der Euklid Distanz (ED) der 20 Referenzstämme (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig DSMZ) nach 24- und 48stündiger Bebrütung

Stamm- Nummer	SI 24 Stunden	SI 48 Stunden	ED 24 Stunden	ED 48 Stunden
DSMZ 20079		0,053 ± 0,140		6,16 ± 0,69
DSMZ 20080	0,546 ± 0,123	0,560 ± 0,223	4,15 ± 0,85	3,93 ± 1,07
DSMZ 20181	0,111 ± 0,126	0,387 ± 0,150	9,09 ± 2,66	5,08 ± 0,69
DSMZ 20187	0,726 ± 0,040	0,652 ± 0,269	3,02 ± 0,25	3,21 ± 1,14
DSMZ 20555	0,272 ± 0,085	0,422 ± 0,078	6,11 ± 0,75	4,97 ± 0,55
DSMZ 2601	0,626 ± 0,079	0,576 ± 0,039	3,65 ± 0,49	3,95 ± 0,25
DSMZ 5457	0,728 ± 0,034	0,692 ± 0,11	2,99 ± 0,21	3,21 ± 0,71

Die Abbildungen 4 bis 7 zeigen die Indizes SI und ED der Stämme in Abhängigkeit vom Identifizierungsergebnis.

In Abbildung 4 sind die Mittelwerte von 5 der 20 Stämme aufgelistet, die vom MIDI-System nach 24stündiger Bebrütungszeit im Taxon bestätigt wurden. Drei Stämme (*L. paracasei* ss *paracasei*, *L. coryniformis* ss *torquens* und *L. paracasei* ss *paracasei*) wiesen einen SI von $> 0,6$ und eine ED von < 4 auf, also eine Qualität, die auf eine große Übereinstimmung mit den in der Datenbank hinterlegten bzw. vorgeschlagenen Taxa schließen lässt. Die übrigen zwei Arten erreichten jedoch einen sehr niedrigen SI und eine hohe ED (*L. reuteri*, *L. buchneri*). Nach 48stündiger Anzucht wiesen die ersteren drei Stämme ebenfalls einen SI $> 0,6$ und eine ED < 4 auf (Abb. 5); die Befunde nach 24- und 48stündiger Bebrütung waren gleich. 7 Stämme (*L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* [*L. casei* ss *rhamnosus*], *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. alimentarius*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. zeae*) wurden in ihrem Taxon vom MIDI-System nicht bestätigt. Bei den 10fach-Bestimmungen lagen allerdings sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubation gleiche Ergebnisse vor. Bei 5 Stämmen lag der SI nach 48 Stunden Anzucht höher als nach 24 Stunden und umgekehrt verhielt sich die ED (Abb. 6).

Die 6 übrigen Stämme konnten weder nach 24- noch nach 48stündiger Bebrütungszeit mittels ihrer Membranfettsäurespektren richtig zugeordnet werden. Zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen von SI und ED wurden die Ergebnisse des an der ersten Stelle stehenden Taxons verwendet. Bei vier Stämmen (*L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* ss *delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*) lag der SI nach 24 Stunden Anzucht höher als nach 48 Stunden (Abb. 7).

5.2 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen

Es wurden 20 Laktobazillenstämmen (Tab. 5) hinsichtlich ihrer Bacteriocinproduktion gegenüber 15 Streptokokkenstämmen (Indikatorstämmen) untersucht.

Bei den Indikatorstämmen handelt es sich um Stämme von *Streptococcus mutans* mit den Serotypen c, e, f, sowie den Serotypen d und g von *S. sobrinus*. Desweiteren wurden die oralen Streptokokken *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* und *S. salivarius* als Indikatorstämmen eingesetzt. Zur Bacteriocintestung wurde der Agardiffusionstest nach Fredericq (1948), modifiziert nach Scharff (2004), herangezogen, bei dem die Inhibierung des Indikatorstammes durch die Ausbildung eines Hemmhofes um eine Makrokolonie des Teststammes bewertet wird.

Jeweils 0,1 ml der in Rogosabouillon angezüchteten Teststämmen wurden in einem Raster (Abb. 1) auf einem Basalmedium verimpft und 48 Stunden angezüchtet. Insgesamt wurden 315 Makrokolonien angeimpft; der mittels Stechzirkel und Lineal ermittelte mittlere Durchmesser von 100 Makrokolonien lag bei $8,1 \pm 0,1$ mm.

Die Makrokolonien wurden mit dem jeweiligen Indikatorstamm im Deckschichtagar überschichtet. Zur besseren Diffusion gebildeter Bacteriocine in den Deckschichtagar erfolgte vor der Bebrütung des Indikatorstammes eine einstündige Lagerung der Petrischalen im Kühlschrank bei +4°C. In Anlehnung an Scharff (2004) wurden die Hemmhöfe nach 48stündiger Bebrütung registriert, weil sie im Vergleich zur 24stündigen Inkubation schärfer abgegrenzt waren.

Bei 13 der 20 Stämme (Tab. 10) konnte eine Bacteriocinproduktion nachgewiesen werden. Die Arten *L. paracasei* ss *paracasei* (DSMZ 20008), *L. paracasei* ss *tolerans* (DSMZ 20012), *L. rhamnosus* (DSMZ 20021), *L. brevis* (DSMZ 20054), *L. delbrueckii* ss *delbrueckii* (DSMZ 20074), *L. gasseri* (DSMZ 20077) und *L. acidophilus* (DSMZ 20079) bildeten keine Bacteriocine.

Tabelle 10: Bacteriocinogene Laktobazillen (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DSMZ)

Stamm-Nummer	Taxon
DSMZ 20001	<i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i>
DSMZ 20004	<i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>
DSMZ 20011	<i>L. casei</i>
DSMZ 20016	<i>L. reuteri</i>
DSMZ 20022	<i>L. rhamnosus</i>
DSMZ 20057	<i>L. buchneri</i>
DSMZ 20072	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i>
DSMZ 20080	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i>
DSMZ 20181	<i>L. alimentarius</i>
DSMZ 20187	<i>L. zeae</i>
DSMZ 20555	<i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>
DSMZ 2601	<i>L. plantarum</i>
DSMZ 5457	<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>

5.2.1 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. mutans*

9 der 13 bacteriocinogenen Laktobazillen (45% der Teststämme) konnten die Serotypen c, e und f von *S. mutans* im Wachstum unterdrücken (Tab. 11). Dabei hemmten 8 Stämme (40% der Teststämme) den Serotyp e. Drei dieser Stämme und ein weiterer (20%) bildeten gegen den Serotyp c Bacteriocine. Drei Stämme unterdrückten sowohl *S. mutans* NCTC 10449 als auch den Stamm Ingbritt im Wachstum. Letzterer wurde zusätzlich durch einen weiteren Stamm inhibiert. Die Serotyp-f-Stämme wurden durch zwei (10%) der bereits gegen den Serotyp c aktiven Stämme gehemmt, wobei gegen QP50-1 zwei und gegen SE11 ein Teststamm aktiv war.

Tabelle 11: Bacteriocinproduzierende Laktobazillen gegen *S. mutans*

Teststämme	Indikatorstämme – Serotypen <i>S. mutans</i>					
	c		e		f	
	NCTC 10449	Ingbritt	LM7	V100	QP50-1	SE11
DSMZ 20001 <i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i>			•			
DSMZ 20004 <i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>			•			
DSMZ 20011 <i>L. casei</i>		•				
DSMZ 20022 <i>L. rhamnosus</i>			•			
DSMZ 20080 <i>L. delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i>			•			
DSMZ 20181 <i>L. alimentarius</i>			•			
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	•	•	•	•	•	
DSMZ 2601 <i>L. plantarum</i>	•	•	•	•	•	•
DSMZ 5457 <i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>	•	•	•			

Mediane der Hemmhöfe: Die Einzelbefunde sind in Abbildung 8 und Tabelle 27 (Anhang) dargestellt. Die Durchmesser der Hemmhöfe lagen bei dem Indikatorstamm NCTC 10449 zwischen 10 und 10,5 mm, bei Ingbritt zwischen 10 und 11 mm, bei LM7 zwischen 10 und 11,5 mm, bei V100 bei 10 mm, bei QP50-1 bei 11 und 12 mm und bei SE11 bei 13 mm.

Die mittleren Durchmesser der Hemmhöfe, die im Bakterienrasen von *S. mutans* NCTC 10449 gebildet wurden, lagen bei 10,2 mm, beim Stamm Ingbritt bei 10,5 mm, bei LM7

bei 10,5 mm, bei V100 bei 10 mm und bei QP50-1 bei 11,5 mm. Der größte Hemmhofdurchmesser wurde mit 13 mm durch *Lactobacillus plantarum* gegen den Indikatorstamm SE11 registriert. In der Rangfolge erwiesen sich 40% der untersuchten Laktobazillen gegen den Stamm LM7 (e) als bacteriocinogen, 20% waren bacteriocinogen gegenüber dem Stamm Ingbritt (c), 15% der Laktobazillen richteten ihre Bacteriocinogenität gegen *S. mutans* NCTC 10449 (c) und jeweils 10% der Stämme gegen QP50-1 und V 100 (f); mit 5% reagierten die wenigsten Laktobazillen auf den Stamm SE11 (f).

5.2.2 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. sobrinus*

S. sobrinus – und dabei nur der Serotyp d - wurde insgesamt von vier Laktobazillen (20% der Teststämme) im Wachstum gehemmt (Tab. 12). Drei der aktiven Laktobazillen (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*) bildeten auch Bacteriocine gegen *S. mutans*.

Tabelle 12: Bacteriocinproduzierende Laktobazillen gegen *S. sobrinus*

Teststämme	Indikatorstämme - Serotypen <i>S. sobrinus</i>	
	d OMZ 176	g OMZ 65
DSMZ 2601 <i>L. plantarum</i>	•	
DSMZ 20187 <i>L. zeae</i>	•	
DSMZ 20011 <i>L. casei</i>	•	
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	•	

Mediane der Hemmhöfe: Die Befunde sind in Abbildung 9 und Tabelle 27 (Anhang) dargestellt. Die Durchmesser der Hemmhöfe lagen zwischen 10 und 12 mm und der mittlere Durchmesser lag bei 10,8 mm. *L. salivarius* ss *salivarius* (DSMZ 20555) konnte einen maximalen Hemmhof von 12 mm im Bakterienrasen von *S. sobrinus* OMZ 176 hervorrufen.

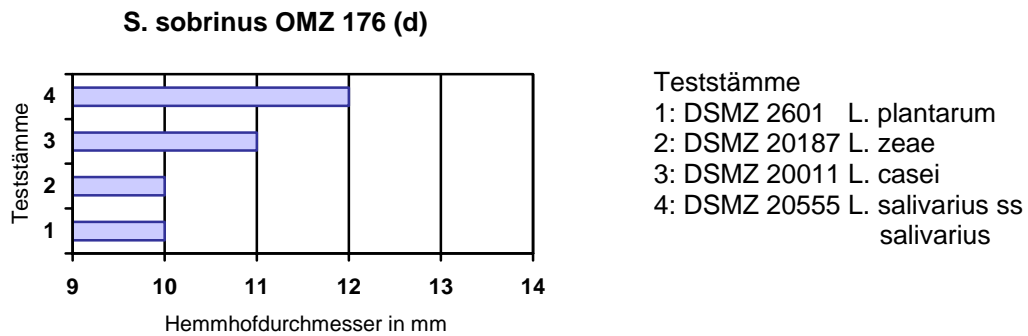


Abbildung 9: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen den Serotyp d von *S. sobrinus* OMZ 176

5.2.3 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. sanguis*

Die Bacteriocinproduktion der Laktobazillen gegen *S. sanguis* ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Bacteriocinproduzierende Laktobazillen gegen *S. sanguis*

Teststämme	Indikatorstämme <i>S. sanguis</i>	
	OMZ 9S	HG1473
DSMZ 20011 L. casei	•	
DSMZ 20016 L. reuteri	•	•
DSMZ 20057 L. buchneri	•	•
DSMZ 20072 L. delbrueckii ss lactis		•
DSMZ 20187 L. alimentarius	•	•
DSMZ 20555 L. salivarius ss salivarius		•
DSMZ 2601 L. plantarum	•	•
DSMZ 5457 L. paracasei ss paracasei		•

Insgesamt inhibierten 8 Stämme *S. sanguis*. *S. sanguis* HG1473 war gegenüber 7 (35%) Laktobazillen sensibel und *S. sanguis* OMZ 9S gegenüber vier von diesen und einer weiteren Laktobazille (25%). Vier der gegen *S. sanguis* aktiven Teststämme (*L. casei*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*) bildeten auch Bacteriocine gegen *S. mutans* und drei von diesen und ein weiterer bildeten auch Bacteriocine gegen *S. sobrinus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. zeae*, *L. salivarius* ss *salivarius*) (Tab. 11, 12).

Mediane der Hemmhöfe: Die Einzelbestimmungen sind in den Abbildungen 10 und 11 und Tabelle 28 (Anhang) dargestellt. Die Mediane der Hemmhöfe lagen bei den Stämmen von *S. sanguis* bei OMZ 9S zwischen 11 und 19 mm und bei HG1473 zwischen 10,5 und 18 mm. Die relativ große Spannweite der Hemmhöfe war bei beiden Stämmen ähnlich. Ein Hemmhofdurchmesser von 19 mm trat bei *S. sanguis* OMZ 9S zweimal auf; einmal durch *L. buchneri* (DSMZ 20057) und einmal durch *L. zeae* (DSMZ 20187) verursacht. Ein mittlerer Durchmesser der Hemmhöfe von 15,3 mm lag bei *S. sanguis* OMZ 9S vor, und bei *S. sanguis* HG1473 wurde er mit 13,6 mm bestimmt.

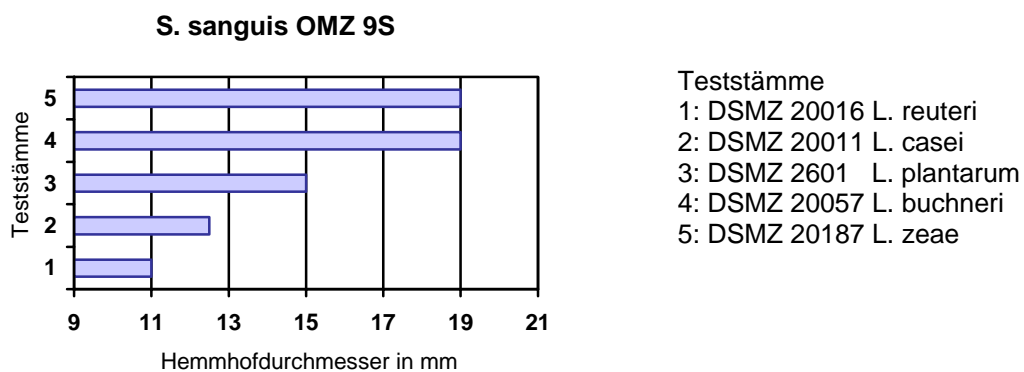


Abbildung 10: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen *S. sanguis* OMZ 9S

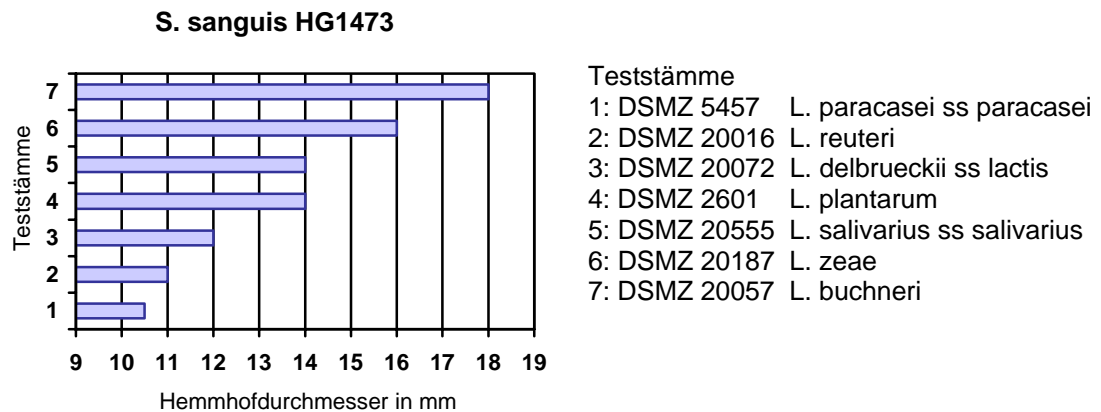


Abbildung 11: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen *S. sanguis* HG1473

5.2.4 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. oralis*

7 der 20 Teststämme (35%) produzierten Bacteriocine, gegen die sich *S. oralis* als sensibel erwies (Tab. 14). Von allen 7 Laktobazillen wurden *S. oralis* HG1290 und HG1601 in ihrem Wachstum inhibiert.

6 der bacteriocinogenen Stämme (*L. buchneri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* ss *salivarius*, *L. zeae*) waren gleichzeitig gegenüber *S. sanguis* aktiv (Anhang Tab. 28). Drei der 6 Laktobazillen und eine weitere Laktobazille (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*, *L. rhamnosus*) produzierten auch gegen *S. mutans* gerichtete Bacteriocine; davon inhibierten drei und ein weiterer Stamm (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*, *L. zeae*) auch die Serotypen von *S. sobrinus*.

Tabelle 14: Bacteriocinproduzierende Laktobazillen gegen *S. oralis*

Teststämme	Indikatorstämme <i>S. oralis</i>	
	HG1290	HG1601
DSMZ 20011 <i>L. casei</i>	•	•
DSMZ 20016 <i>L. reuteri</i>	•	•
DSMZ 20022 <i>L. rhamnosus</i>	•	•
DSMZ 20057 <i>L. buchneri</i>	•	•
DSMZ 20187 <i>L. zeae</i>	•	•
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	•	•
DSMZ 2601 <i>L. plantarum</i>	•	•

Mediane der Hemmhöfe: Die Mediane der Hemmhöfe sind in den Abbildungen 12 und 13 und in Tabelle 28 (Anhang) dargestellt. Die Mediane der Hemmhöfe lagen zwischen 10 und 19,5 mm bei *S. oralis* HG1290 und bei HG1601 zwischen 10 und 20,5 mm. Der mittlere Hemmhofdurchmesser der bacteriocinogenen Laktobazillen wurde für *S. oralis* HG1290 mit 14,6 mm bestimmt und der für *S. oralis* HG1601 lag bei 14,9 mm. Ein Hemmhofdurchmesser von 20,5 mm wurde im Bakterienrasen von *S. oralis* HG1601 durch *L. zeae* (DSMZ 20187) verursacht; dieser Hemmhof war in der Gesamtbetrachtung der Untersuchungen der größte gebildete Hemmhof.

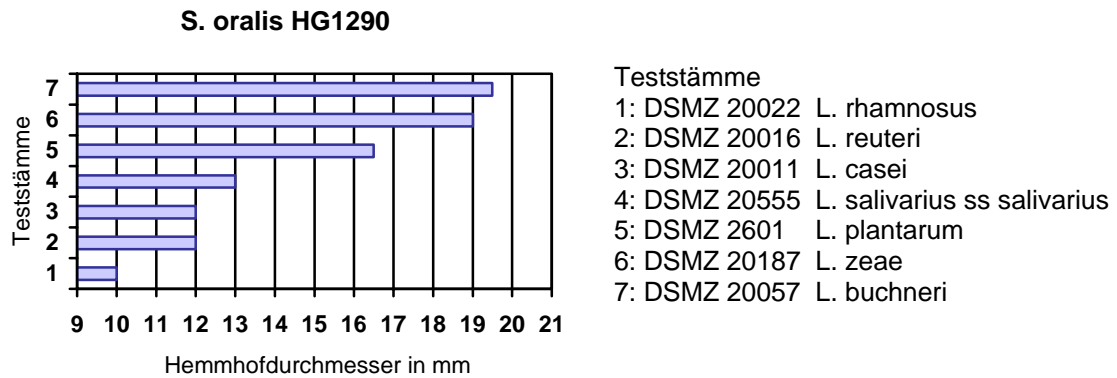


Abbildung 12: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen *S. oralis* HG1290

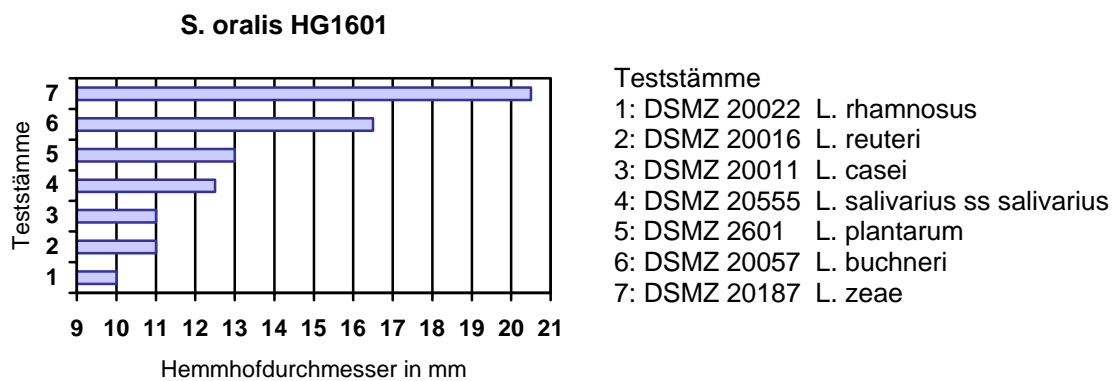


Abbildung 13: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen *S. oralis* HG1601

5.2.5 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. mitis* und *S. gordonii*

Gegen *S. mitis* waren drei Laktobazillen bacteriocinogen (Tab. 15). Diese drei Stämme bildeten auch gegen *S. mutans* und zwei von ihnen (*L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*) auch gegen *S. sobrinus*, *S. sanguis* und *S. oralis* gerichtete Bacteriocine. Zwei der aktiven Teststämme gegen *S. mitis* (*L. coryniformis* ss *torquens*, *L. salivarius* ss *salivarius*) hemmten ebenso das Wachstum von *S. gordonii* (Tab. 16). Der Teststamm *L. plantarum* (DSZM 2601) bildete kein Bacteriocin gegen *S. gordonii*. Insgesamt erwiesen sich 15% der Laktobazillen bacteriocinogen gegenüber *S. mitis* und 10% bacteriocinogen gegenüber *S. gordonii*.

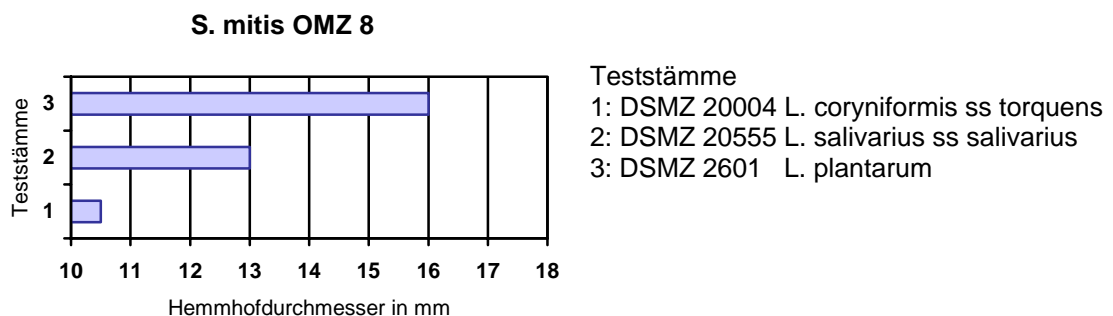
Tabelle 15: Bacteriocinproduzierende Laktobazillen gegen *S. mitis*

Teststämme	Indikatorstamm <i>S. mitis</i> OMZ 8
DSMZ 20004 <i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>	•
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	•
DSMZ 2601 <i>L. plantarum</i>	•

Tabelle 16: Bacteriocinproduzierende Laktobazillen gegen *S. gordonii*

Teststämme	Indikatorstamm <i>S. gordonii</i> HG295
DSMZ 20004 <i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>	•
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	•

Mediane der Hemmhöfe: Die Durchmesser der Hemmhöfe gegen *S. mitis* lagen zwischen 10,5 und 16 mm und im Mittel bei 13,2 mm. Der maximale Hemmhof von 16 mm im Bakterienrasen von *S. mitis* wurde durch *L. plantarum* (DSMZ 2601) verursacht (Abb. 14, Anhang Tab. 28). Bei *S. gordonii* lagen die Durchmesser der Hemmhöfe bei 10 und 11 mm (Abb. 15).

**Abbildung 14:** Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen *S. mitis* OMZ 8

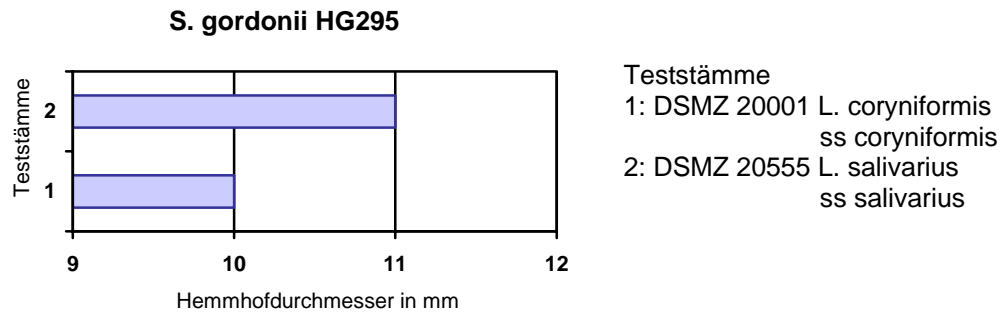


Abbildung 15: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen *S. gordonii* HG295

5.2.6 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. salivarius*

L. salivarius ss *salivarius* (DSMZ 20555) hemmte als einzige Laktobazille (5% der Stämme) *S. salivarius* OMZ 47 im Wachstum (Tab. 17).

Tabelle 17: Bacteriocinproduzierende Laktobazillen gegen *S. salivarius*

Teststamm	Indikatorstamm <i>S. salivarius</i> OMZ 47
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	•

Median des Hemmhofes: Bei *S. salivarius* OMZ 47 konnte ein Hemmhofdurchmesser von 10,5 mm gemessen werden (Abb. 16, Anhang Tab. 28).

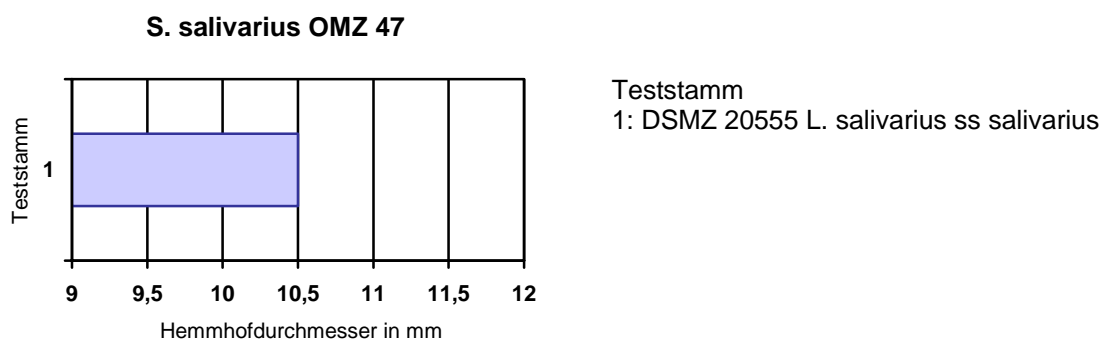


Abbildung 16: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen *S. salivarius* OMZ 47

5.3 Synopse der Befunde

Zur Bewertung der chemotaxonomischen Identifizierung von Laktobazillen mittels Membranfettsäurespektren wurde auf 20 Referenzstämme (Tab. 5) zurückgegriffen. Die Ergebnisse waren unbefriedigend, denn nur ein Drittel der Stämme wurde von der Datenbank des Microbial Identification Systems (MIDI, Newark, USA) richtig erkannt (Abb. 3).

Die gleichen Stämme (Tab. 5) wurden hinsichtlich ihrer Bacteriocinogenität untersucht; Streptokokken wurden als Indikatorstämme eingesetzt. 13 der 20 Laktobazillenstämme produzierten Bacteriocine. In Abbildung 17 ist die Aktivität der jeweiligen Laktobazillen gegenüber der Gesamtzahl der Indikatorstämme prozentual dargestellt. *L. plantarum* (DSMZ 2601) und *L. salivarius* ss *salivarius* (DSMZ 20555) erwiesen sich gegenüber 80% der Indikatorstämme als bacteriocinogen. In absteigender Rangfolge folgten *L. casei* (DSMZ 20011) und *L. zeae* (DSMZ 20187) mit einer Bacteriocinogenität gegenüber 33,3% der als Indikatorstämme ausgewählten Streptokokken. *L. reuteri* (DSMZ 20016), *L. buchneri* (DSMZ 20057) und *L. paracasei* ss *paracasei* (DSMZ 5457) hemmten 26,6%, *L. coryniformis* ss *torquens* (DSMZ 20004) und *L. rhamnosus* (DSMZ 20022) 14,3% der Streptokokken. *L. coryniformis* ss *coryniformis* (DSMZ 20001), *L. delbrueckii* ss *lactis* (DSMZ 20072), *L. delbrueckii* ss *bulgaricus* (DSMZ 20080) und *L. alimentarius* (DSMZ 20181) unterdrückten nur jeweils 4,8% der Indikatorstämme.

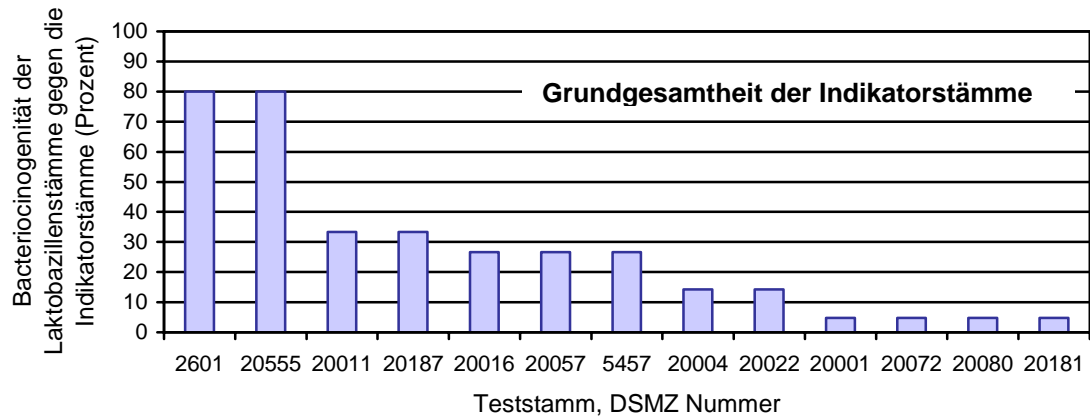


Abbildung 17: Bacteriocinogenität der Laktobazillenarten (Teststämme) gegenüber Streptokokken als Indikatorstämme

(DSMZ 2601 *L. plantarum*, DSMZ 20555 *L. salivarius* ss *salivarius*, DSMZ 20011 *L. casei*, DSMZ 20187 *L. zeae*, DSMZ 20016 *L. reuteri*, DSMZ 20057 *L. buchneri*, DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*, DSMZ 20004 *L. coryniformis* ss *torquens*, DSMZ 20022 *L. rhamnosus*, DSMZ 20001 *L. coryniformis* ss *coryniformis*, DSMZ 20072 *L. delbrueckii* ss *lactis*, DSMZ 20080 *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, DSMZ 20181 *L. alimentarius*)

In Abbildung 18 und Tabelle 29 (Anhang) sind die Mittelwerte der gebildeten Hemmhöfe mit ihren Standardabweichungen dargestellt.

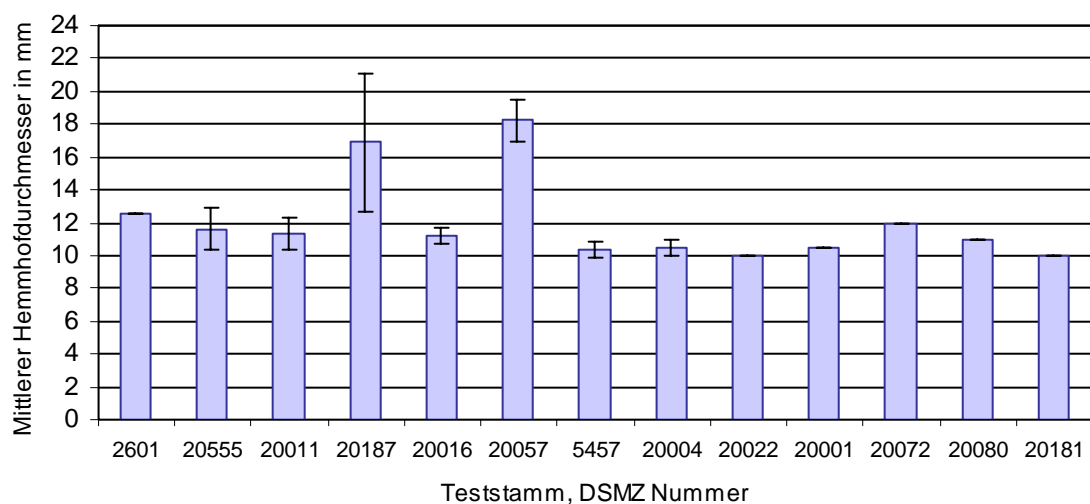


Abbildung 18: Mittlere gebildete Hemmhofdurchmesser ($\bar{x} \pm SD$) durch bacteriocinogene Laktobazillenarten im Indikatorstammrassen bei sensiblen Streptokokken

(DSMZ 2601 *L. plantarum*, DSMZ 20555 *L. salivarius* ss *salivarius*, DSMZ 20011 *L. casei*, DSMZ 20187 *L. zeae*, DSMZ 20016 *L. reuteri*, DSMZ 20057 *L. buchneri*, DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*, DSMZ 20004 *L. coryniformis* ss *torquens*, DSMZ 20022 *L. rhamnosus*, DSMZ 20001 *L. coryniformis* ss *coryniformis*, DSMZ 20072 *L. delbrueckii* ss *lactis*, DSMZ 20080 *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, DSMZ 20181 *L. alimentarius*)

Es fällt auf, dass sich bei einigen Stämmen die Hemmhofgröße umgekehrt proportional zur Häufigkeit ihrer Bacteriocinogenität verhält. So verursachten *L. plantarum* (DSMZ 2601) und *L. salivarius* ss *salivarius* (DSMZ 20555), die Stämme mit der häufigsten Bacteriocinogenität (80%) (Abb. 17), nur kleine Hemmhöfe von 12,5 mm bzw. von 11,6 mm im Bakterienrasen der Indikatorstämme. Mit einer durchschnittlichen gebildeten Hemmhofgröße von 11,3 mm und einer Bacteriocinogenität von 33,3% gegenüber den Indikatorstämmen (Abb. 17) verhielt sich der Stamm *L. casei* (DSMZ 20011) ähnlich. Der mittlere Hemmhof, den *L. reuteri* (DSMZ 20016) und *L. paracasei* ss *paracasei* (DSMZ 5457) bei je 26,6% der Indikatorstämme erzeugten (Abb. 18), lag bei 11,3 bzw. bei 10,4 mm. *L. delbrueckii* ss *lactis* (DSMZ 20072) und *L. delbrueckii* ss *bulgaricus* (DSMZ 20080) inhibierten jeweils 4,8% der Indikatorstämme (Abb. 17) bei einem mittleren Hemmhofdurchmesser von 12 bzw. 11 mm. Die Stämme *L. coryniformis* ss *coryniformis* (DSMZ 20001) und *L. coryniformis* ss *torquens* (DSMZ 20004) besaßen nur eine geringe Bacteriocinogenität; die Hemmhöfe lagen im Mittel bei 10,5 mm. Mittlere Hemmhöfe von 10 mm konnten bei *L. alimentarius* (DSMZ 20181) und *L. rhamnosus* (DSMZ 20022) gemessen werden; die Bacteriocinogenität beider Stämme war ebenso gering (Abb. 17). Die größten Hemmhöfe im Bakterienrasen der Indikatorstämme produzierten Stämme mit einer Aktivität zwischen 27 und 33% (Abb. 17). Es handelte sich dabei um *L. buchneri* (DSMZ 20057) mit einem mittleren Hemmhof von 18,3 mm und um *L. zeae* (DSMZ 20187) mit einem mittleren Hemmhof von 16,9 mm. Insgesamt bildeten 13 Laktobazillenstämme bzw. Arten gegen 14 Streptokokkenstämme von 7 Streptokokkenarten Bacteriocine. In Tabelle 18 sind die gefundenen Bacteriocinprofile der Laktobazillenstämme und gleichzeitig die Sensibilitätsprofile der Streptokokkenstämme aufgeführt.

Abbildung 19 verdeutlicht, dass der Stamm *S. mutans* LM7 am häufigsten durch die Teststämme (38,1%) in seinem Wachstum beeinflusst wurde. Absteigend folgten die Stämme HG1473, HG1290 und HG1601, die gegenüber 33,3% der Laktobazillen sensibel waren. *S. sanguis* OMZ 9S und *S. mutans* Ingbritt wurden von je 24% der Laktobazillen im Wachstum gehemmt. 19% der Laktobazillen beeinflussten *S. sobrinus* OMZ 176 und je 14,3% waren bacteriocinogen gegenüber *S. mutans* NCTC 10449 und gegenüber *S. mitis* OMZ 8. *S. mutans* QP50-1, V100 und *S. gordonii* HG295 wurden zu je 9,5% inhibiert. Nahezu immun erwiesen sich *S. salivarius* OMZ 47 und *S. mutans* SE11.

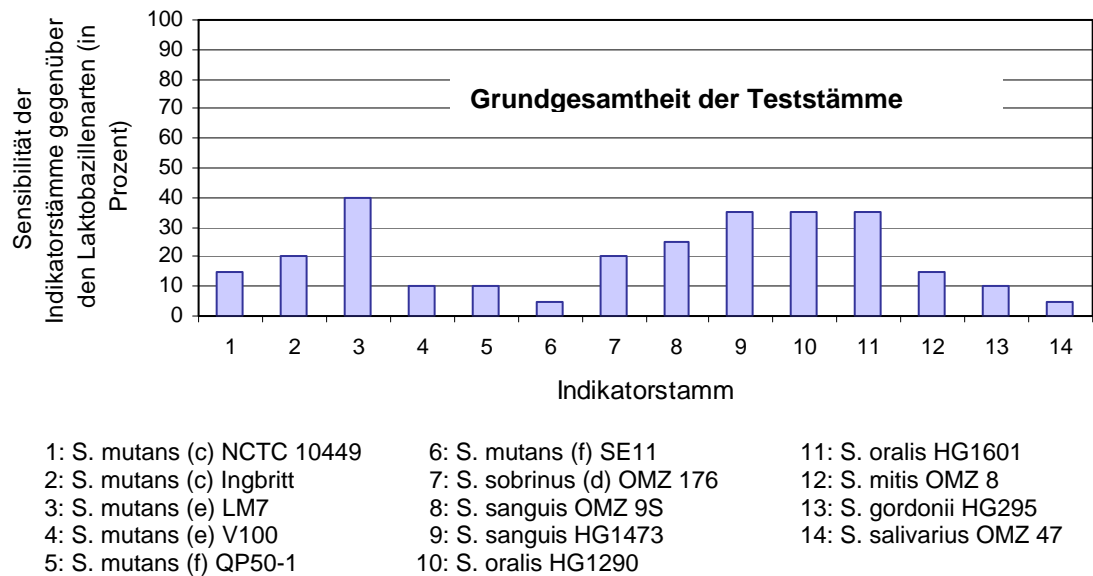


Abbildung 19: Sensibilität (in Prozent) der Streptokokken (Indikatorstämme) gegenüber bacteriocinogenen Laktobazillenarten

In Abbildung 20 und in Tabelle 30 (Anhang) sind die Mittelwerte der gebildeten Hemmhöfe im Bakterienrasen sensibler Indikatorstämme mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Der kleinste gebildete mittlere Hemmhof konnte bei *S. mutans* (e) V100 mit 10 mm und einer Sensibilität gegenüber 10% der Laktobazillen ermittelt werden. Der größte mittlere Hemmhof wurde bei *S. sanguis* OMZ 9S registriert, die Streptokokke war gegenüber 25% der Laktobazillenstämme sensibel. Es fällt auf, dass die Stärke der Sensibilität und die Mittelwerte der gebildeten Hemmhöfe bei fast allen Indikatorstämmen miteinander korrelierten. Eine Ausnahme bildete *S. mutans* (e) LM7. Bei einer Sensibilität gegenüber 40% der Laktobazillen hatte der mittlere Hemmhof nur einen Durchmesser von 10,5 mm. Ähnlich verhielt sich *S. mutans* (f) SE11; bei einer Sensibilität gegenüber 5% der Laktobazillen war der Hemmhof 13 mm groß. Bei *S. sanguis* HG1473 und *S. oralis* HG1290 und HG1601 mit einer jeweiligen Sensibilität gegenüber 35% der Teststämme konnten mittlere Hemmhofdurchmesser von 13,6 mm, 14,6 mm und 13,5 mm ermittelt werden. Ein mittlerer Hemmhof von 10,8 mm und 10,5 mm lagen bei *S. sobrinus* (d) OMZ 176 bzw. bei *S. mutans* (c) Ingbritt vor; beide Stämme waren gegenüber 20% der Teststämme empfindlich. Bei einer Sensibilität gegenüber 15% der Laktobazillen konnten bei *S. mutans* (c) NCTC 10449 und bei *S. mitis* OMZ 8 mittlere Hemmhofdurchmesser von 10,2 mm bzw. von 13,2 mm registriert werden. Gegenüber

10% der Laktobazillen waren *S. mutans* (e) V100, *S. mutans* (f) QP50-1 und *S. gordonii* HG295 mit einem mittleren Hemmhofdurchmesser von 10, 11,5 bzw. 10,5 mm empfindlich. Bei *S. salivarius* OMZ 47 wurde ein mittlerer Hemmhofdurchmesser von 10,5 mm bestimmt; die Streptokokke war gegen 5% der Teststämme sensibel.

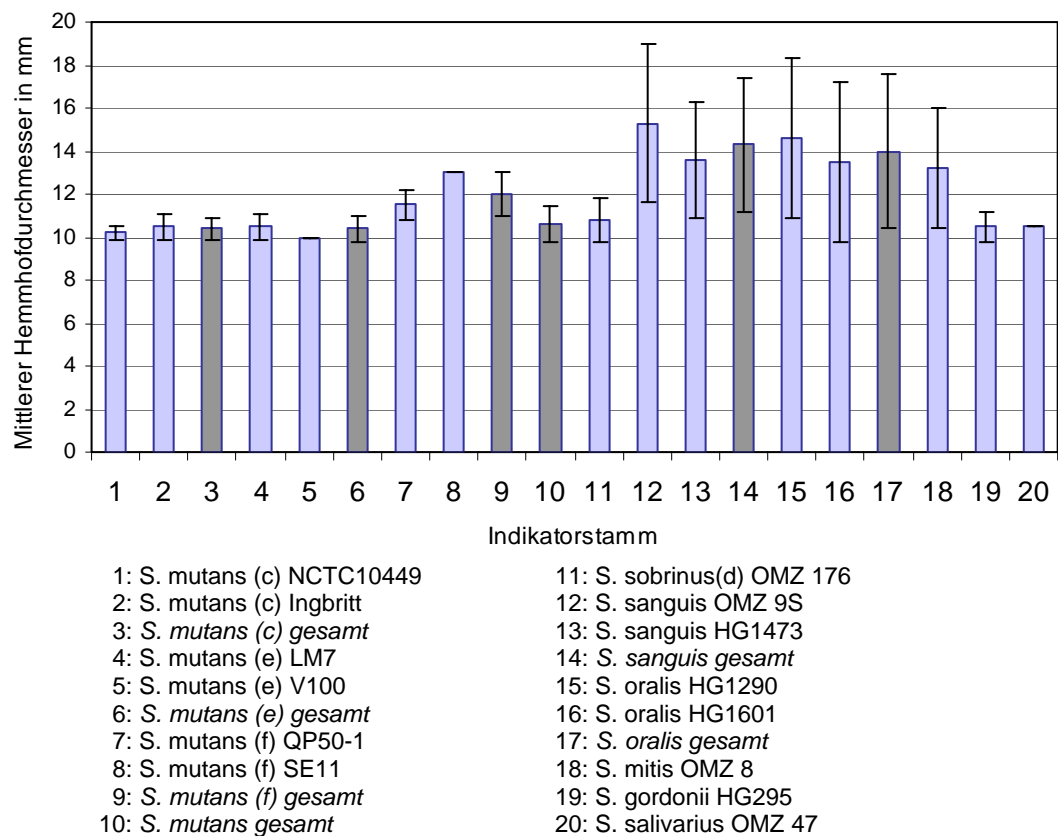
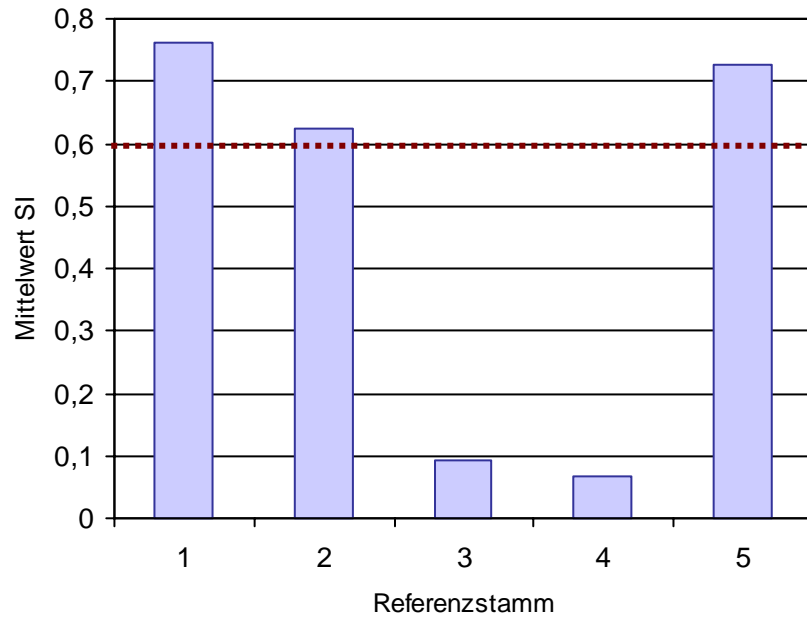
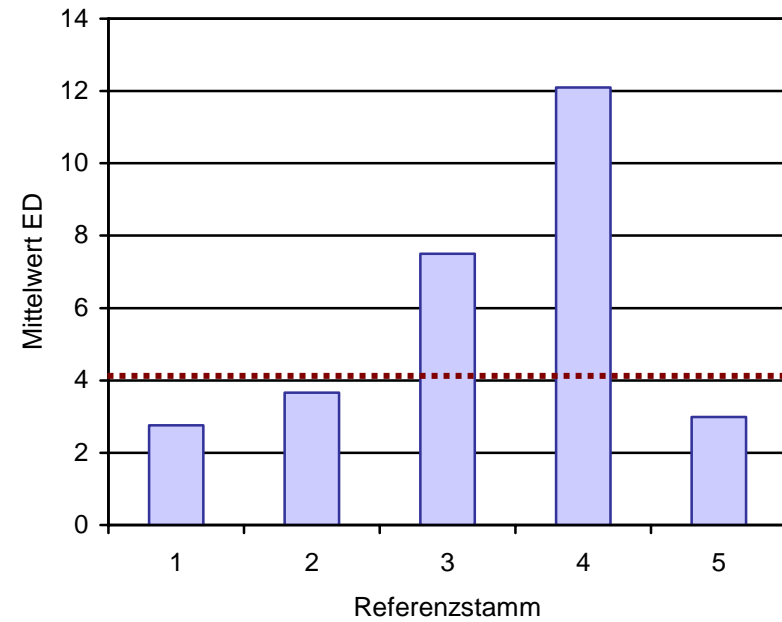


Abbildung 20: Mittlere Hemmhofdurchmesser ($\bar{x} \pm SD$) im Bakterienrasen sensibler Streptokokken (Indikatorstämme) durch bacteriocinogene Laktobazillen

Die aufgefundenen Hemmpfade sind zusammenfassend in Tabelle 18 dargestellt. Insgesamt kamen 10 Hemmpfade vor. Im Hemmpfad (HP) der häufig im Speichel vorkommenden Arten *L. plantarum* und *L. salivarius* ss *salivarius* waren jeweils 12 (HP I, HP II), bei *L. casei* und *L. zeae* fünf (HP III, HP IV), bei *L. reuteri*, *L. buchneri* und *L. paracasei* ss *paracasei* jeweils vier (HP V, HP VI), bei *L. coryniformis* ss *torquens* und *L. rhamnosus* drei (HP VII, HP VIII) und bei *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. alimentarius* und *L. delbrueckii* ss *lactis* jeweils ein (HP IX, HP X) Indikatorstamm eingeschlossen.

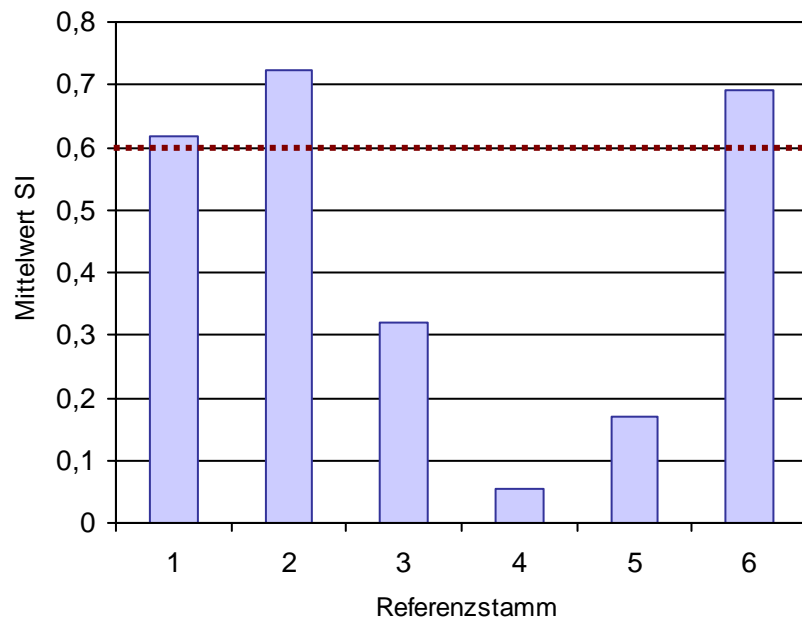


1: DSMZ 20004 *L. coryniformis* ss *torquens*
 2: DSMZ 20008 *L. paracasei* ss *paracasei*
 3: DSMZ 20016 *L. reuteri*
 4: DSMZ 20057 *L. buchneri*
 5: DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*

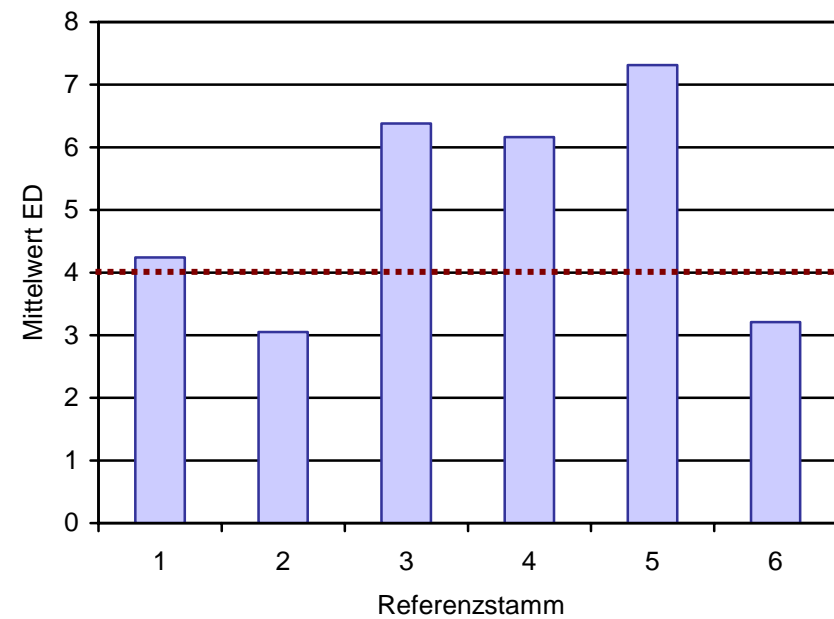


1: DSMZ 20004 *L. coryniformis* ss *torquens*
 2: DSMZ 20008 *L. paracasei* ss *paracasei*
 3: DSMZ 20016 *L. reuteri*
 4: DSMZ 20057 *L. buchneri*
 5: DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*

Abbildung 4: Mittelwerte des Similarity Index (links) und der Euklid Distanz (rechts) der 5 nach 24stündiger Bebrütungszeit richtig identifizierten Stämme (--- Grenzwerte von $SI \geq 0,6$ und $ED \leq 4$ für eine ausreichende Qualität der Ergebnisse)

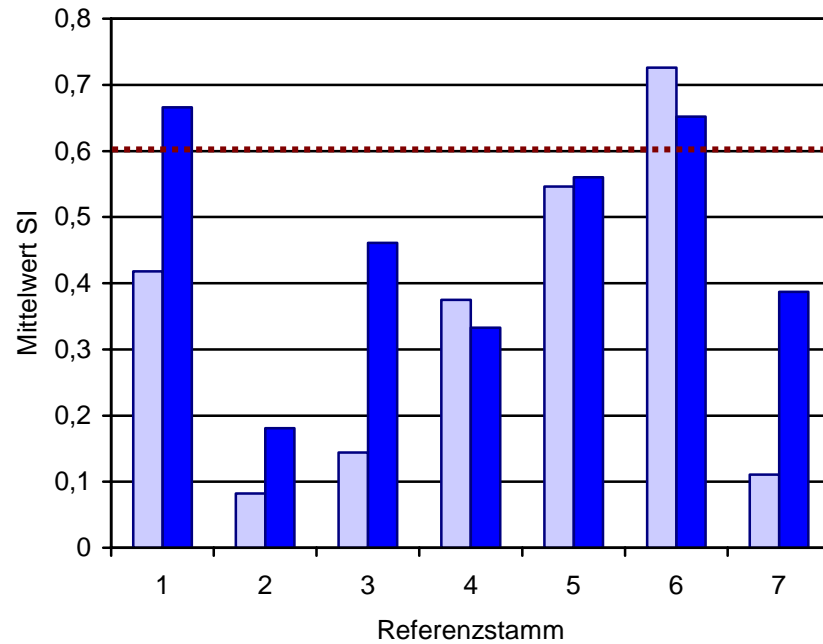


- 1: DSMZ 20004 *L. coryniformis* ss *torquens*
- 2: DSMZ 20008 *L. paracasei* ss *paracasei*
- 3: DSMZ 20016 *L. reuteri*
- 4: DSMZ 20079 *L. acidophilus*
- 5: DSMZ 20054 *L. brevis*
- 6: DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*

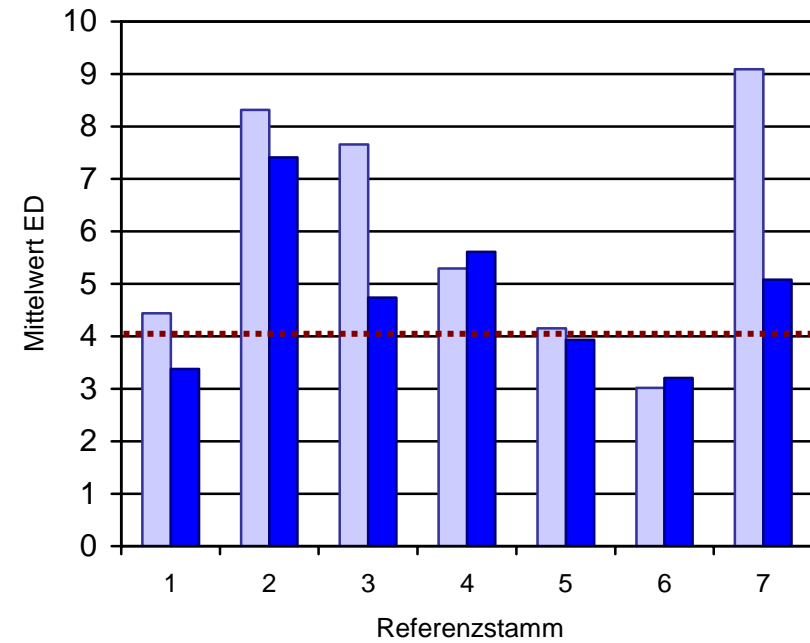


- 1: DSMZ 20004 *L. coryniformis* ss *torquens*
- 2: DSMZ 20008 *L. paracasei* ss *paracasei*
- 3: DSMZ 20016 *L. reuteri*
- 4: DSMZ 20079 *L. acidophilus*
- 5: DSMZ 20054 *L. brevis*
- 6: DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*

Abbildung 5: Mittelwerte des Similarity Index (links) und der Euklid Distanz (rechts) der 6 nach 48stündiger Bebrütungszeit richtig identifizierten Stämme (--- Grenzwerte von SI $\geq 0,6$ und ED ≤ 4 für eine ausreichende Qualität der Ergebnisse)

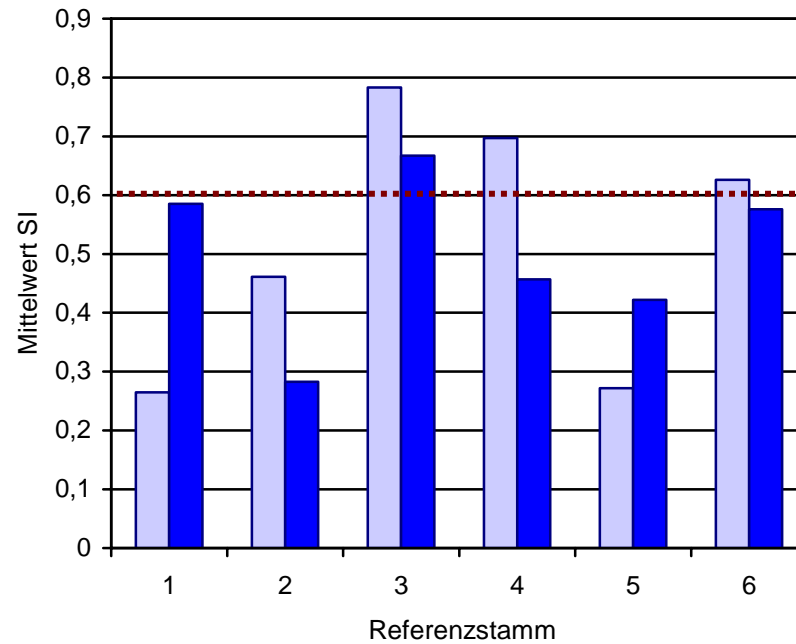


- 1: DSMZ 20001 *L. coryniformis* ss *coryniformis*
- 2: DSMZ 20011 *L. casei*
- 3: DSMZ 20021 *L. rhamnosus* (*L. casei* ss *rhamnosus*)
- 4: DSMZ 20072 *L. delbrueckii* ss *lactis*
- 5: DSMZ 20080 *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*
- 6: DSMZ 20187 *L. zeae*
- 7: DSMZ 20181 *L. alimentarius*

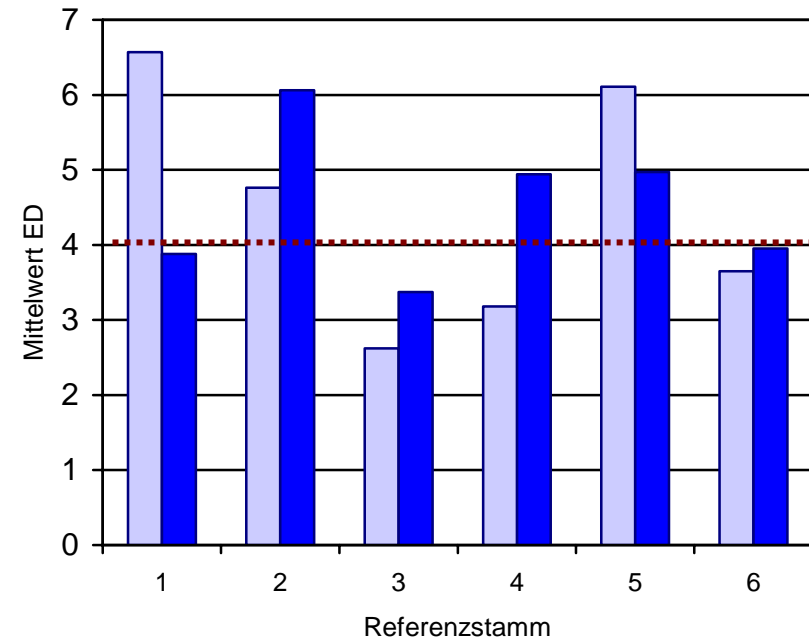


- 1: DSMZ 20001 *L. coryniformis* ss *coryniformis*
- 2: DSMZ 20011 *L. casei*
- 3: DSMZ 20021 *L. rhamnosus* (*L. casei* ss *rhamnosus*)
- 4: DSMZ 20072 *L. delbrueckii* ss *lactis*
- 5: DSMZ 20080 *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*
- 6: DSMZ 20187 *L. zeae*
- 7: DSMZ 20181 *L. alimentarius*

Abbildung 6: Mittelwerte des Similarity Index (links) und der Euklid Distanz (rechts) der 7 nicht in Übereinstimmung mit der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen analysierten Stämme aber gleichen Art nach 24 (hellblau) und 48 (dunkelblau) stündiger Bebrütungszeit (---- Grenzwerte von SI $\geq 0,6$] und ED ≤ 4] für eine ausreichende Qualität der Ergebnisse)



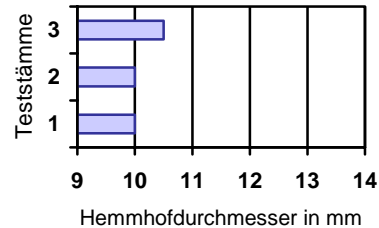
- 1: DSMZ 20012 *L. paracasei* ss tolerans
- 2: DSMZ 20022 *L. rhamnosus*
- 3: DSMZ 20074 *L. delbrueckii* ss delbrueckii
- 4: DSMZ 20077 *L. gasseri*
- 5: DSMZ 20555 *L. salivarius* ss salivarius
- 6: DSMZ 2601 *L. plantarum*



- 1: DSMZ 20012 *L. paracasei* ss tolerans
- 2: DSMZ 20022 *L. rhamnosus*
- 3: DSMZ 20074 *L. delbrueckii* ss delbrueckii
- 4: DSMZ 20077 *L. gasseri*
- 5: DSMZ 20555 *L. salivarius* ss salivarius
- 6: DSMZ 2601 *L. plantarum*

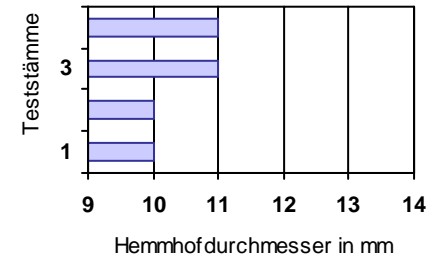
Abbildung 7: Mittelwerte des Similarity Index (links) und der Euklid Distanz (rechts) der 6 nicht in Übereinstimmung mit der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen analysierten Stämme nach 24 (hellblau) und 48 (dunkelblau) stündiger Bebrütungszeit (--- Grenzwerte von SI $\geq 0,6$ und ED ≤ 4 für eine ausreichende Qualität der Ergebnisse)

S. mutans NCTC 10449 (c)



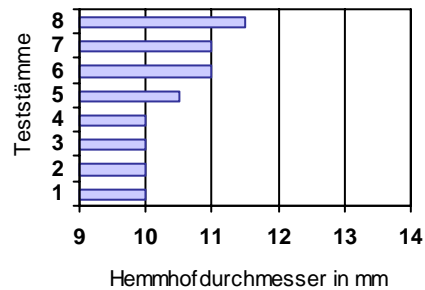
Teststämme
 1: DSMZ 20555 *L. salivarius* ss *salivarius*
 2: DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*
 3: DSMZ 2601 *L. plantarum*

S. mutans Ingbritt (c)



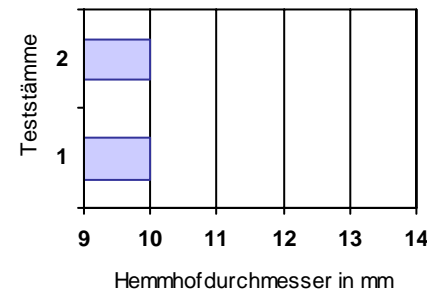
Teststämme
 1: DSMZ 20011 *L. casei*
 2: DSMZ 2601 *L. plantarum*
 3: DSMZ 20555 *L. salivarius* ss *salivarius*
 4: DSMZ 5457 *L. paracasei* ss *paracasei*

S. mutans LM7 (e)



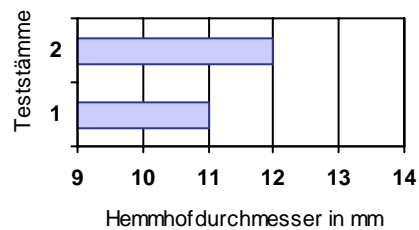
Teststämme
 1: DSMZ 20022 *L. rhamnosus*
 2: DSMZ 5457 *L. paracasei* ss. *paracasei*
 3: DSMZ 2601 *L. plantarum*
 4: DSMZ 20181 *L. alimentarius*
 5: DSMZ 20001 *L. coryniformis* ss *coryniformis*
 6: DSMZ 20004 *L. coryniformis* ss *torquens*
 7: DSMZ 20080 *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*
 8: DSMZ 20555 *L. salivarius* ss *salivarius*

S. mutans V100 (e)



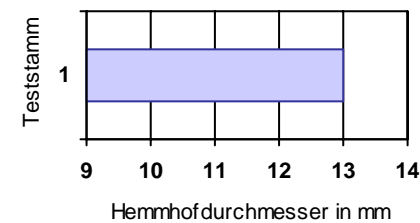
Teststämme
 1: DSMZ 2601 *L. plantarum*
 2: DSMZ 20555 *L. salivarius* ss *salivarius*

S. mutans QP50-1 (f)



Teststämme
 1: DSMZ 20555 *L. salivarius* ss *salivarius*
 2: DSMZ 2601 *L. plantarum*

S. mutans SE11 (f)



Teststamm
 1: DSMZ 2601 *L. plantarum*

Abbildung 8: Bacteriocinbildung bei Laktobazillen gegen die Serotypen c, e und f von *S. mutans*

Tabelle 18: Sensibilität der Streptokokkenstämme und Hemmprofile der Laktobazillen

Teststämme	Sensible Indikatorstämme														Hemm-profile
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
DSMZ 2601 <i>L. plantarum</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			I
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	•	•	•	•	•		•		•	•	•	•	•	•	II
DSMZ 20011 <i>L. casei</i>		•					•	•		•	•				III
DSMZ 20187 <i>L. zeae</i>						•	•	•	•	•					IV
DSMZ 20016 <i>L. reuteri</i>								•	•	•	•				V
DSMZ 20057 <i>L. buchneri</i>								•	•	•	•				V
DSMZ 5457 <i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>	•	•	•						•						VI
DSMZ 20004 <i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>			•										•	•	VII
DSMZ 20022 <i>L. rhamnosus</i>			•							•	•				VIII
DSMZ 20001 <i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i>			•												IX
DSMZ 20080 <i>L. delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i>			•												IX
DSMZ 20181 <i>L. alimentarius</i>			•												IX
DSMZ 20072 <i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i>									•						X

1: *S. mutans* (c) NCTC 10449
2: *S. mutans* (c) Ingbritt
3: *S. mutans* (e) LM 7
4: *S. mutans* (e) V100

5: *S. mutans* (f) QP50-1
6: *S. mutans* (f) SE11
7: *S. sobrinus* (d) OMZ 176
8: *S. sanguis* OMZ 9S

9: *S. sanguis* HG1473
10: *S. oralis* HG1290
11: *S. oralis* HG1601

12: *S. mitis* OMZ 8
13: *S. gordonii* HG295
14: *S. salivarius* OMZ 47

6 Diskussion

Karies ist so alt wie die Menschheit und ist auch heute noch die am weitesten verbreitete Volkskrankheit. Nach Hellwig et al. (1999) ist Zahnkaries eine „lokalisierte, unspezifische, opportunistische Infektionserkrankung mit einer speziellen zivilisationsbedingten Komponente. Sie führt, wenn man die Ursache nicht beseitigt, zu einem progredienten, irreversiblen Zahnhartsubstanzverlust“. Bedeutsame Mikroorganismen für die Kariespathogenese sind die Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und die Aktinomyzeten. Die vorliegende Untersuchung befasste sich mit der Bestimmung und Virulenz der Laktobazillen.

Heute unumstritten müssen kariesauslösende Mikroorganismen zunächst an der Zahnhartsubstanz haften können. Sie sind azidogen und azidophil - produzieren selbst Säuren und lieben das saure Milieu. Säuren bilden sie aus Di- und Monosacchariden der Nahrung und können darüber hinaus als säuretolerante Keime das saure Milieu, das sie selbst schaffen, tolerieren. Mutans-Streptokokken und Laktobazillen unterscheiden sich in den angeführten Charakteristika in der Adhäsionsfähigkeit. Mutans-Streptokokken bilden extra- und intrazelluläre Polysaccharide aus Zuckern und können dadurch an den Zahnflächen „kleben“, während Laktobazillen als Schleimhautparasiten nicht adhäreren können. Der Mensch selbst ist der „Wirt“ im multifaktoriellen Ursachengefüge, das Keyes (1962) und König (1971) mit vier überlappenden Kreisen verständlich machen wollten (Abb. 21).

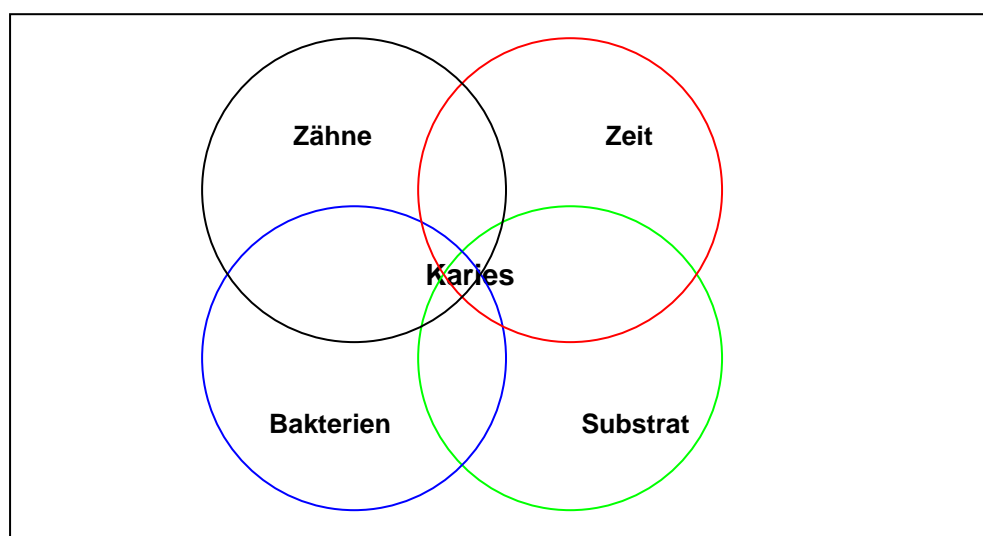


Abbildung 21: Schema der Kariesätiologie nach Keyes (1962) und König (1971)

Dieses multifaktorielle Ursachengefüge der Karies wird zusätzlich durch sekundäre Faktoren beeinflusst. Einer der wichtigsten Faktoren ist der Speichel, der in seiner Zusammensetzung ein natürliches Schutzsystem darstellt. Die Speichelfunktionen schließen z.B. Pufferung von Säuren, Spülfunktion, antibakterielle Aktivitäten und Remineralisation ein (Larmas 1985, Hellwig et al. 1999).

Kariestheorien (Säfte, Würmer, Parasiten, elektrische Ströme) (Bridgeman 1863, Magitots 1867, Abbott 1879, Black 1886 und 1914) waren bis zur chemisch-parasitären Kariestheorie des amerikanischen Zahnarztes W. D. Miller (1853-1907) (Miller 1889) wissenschaftlich nicht haltbar. Die Theorie von Miller beschränkte sich jedoch nur auf die Erklärung des Grundprinzips und besagte, dass die Mikroorganismen der Mundhöhle bzw. ihre Enzyme aus Kohlenhydraten Säure bilden, die zur Entkalkung der Zahnhartsubstanz führt. Die Folge sind kariöse Läsionen.

Laktobazillen als starke Säureproduzenten wurden in der Folge als Verursacher der Karies angesehen. In diesem Zeitraum isolierte und beschrieb bereits Clarke (1924) *Streptococcus mutans* aus kariösen Läsionen. Nachfolgende kontroverse Diskussionen zur Kariesauslösung durch Laktobazillen oder Streptokokken ließen die Streptokokken in Vergessenheit geraten. *Mutans-Streptokokken* erlebten erst zu Beginn der sechziger Jahre wieder eine Renaissance. Ihnen wurde von nun an die größte Bedeutung für den kariösen Prozess beigemessen (Hamada und Slade 1980, Van Houte 1980, Loesche 1986), nachdem sowohl in gnotobiotischen als auch in konventionellen Tierversuchen nach Verabreichung zuckerhaltiger Diät die Kariesauslösung durch Streptokokken nachgewiesen werden konnte (Jay et al. 1936, Orland et al. 1954, 1955, Michalek et al. 1981, Seppä et al. 1989). Durch Laktobazillen konnte später in gnotobiotischen Tierversuchen Fissurenkaries ausgelöst werden (Fitzgerald et al. 1966, Seppä et al. 1989). Michalek et al. (1981) infizierten gnotobiotische Ratten mit Stämmen von Laktobazillen und Streptokokken getrennt und mit Mischkulturen beider Keimgruppen. Die mit Laktobazillen monoinfizierten Tiere entwickelten deutlich weniger Karies als die mit Streptokokken monoinfizierten Tiere. Bei den Tieren, die mit Laktobazillen und Streptokokken infiziert waren, etablierten sich die Laktobazillen vorrangig im Speichel und auf der Zungenoberfläche und die Streptokokken dominierten in der Plaque.

Mit der Entwicklung der keimfreien Versuchstiertechnik konnten letztlich die KOCH'schen Postulate auch auf die Karies übertragen werden. Bei etwa 500 verschiedenen Mikroorganismen in der Mundhöhle war dies zuvor unmöglich, und so

konnten eben auch Würmer bis hin zu Protozoen für die Karies verantwortlich gemacht werden. Seit Mitte des letzten Jahrhunderts ist die infektiöse Komponente der Karies und die zentrale Bedeutung der Mutans-Streptokokken für die Kariesauslösung unumstritten.

Laktobazillen werden heute als Folgekeime der Karies angesehen und treiben durch ihre Milchsäureproduktion den Kariesprozess voran. Sie gelten als Indikatoren eines hohen (Crossner 1981) bzw. frequenten Zuckerkonsums (Gustafsson et al. 1954), der in der „Vipeholm-Studie“ als entscheidend für die kariogene Zuckerwirkung nachgewiesen wurde. Laktobazillen können aber die Auslösung einer Sekundärkaries verursachen, wenn sie in Randspalten eindringen können. Ihre Rolle bei der Entstehung einer Fissurenkaries ist analog der gnotobiotischen Tierexperimente von Michalek et al. (1981) vorstellbar. Nach Shovlin und Gillis (1969, 1972) kommen in kariösem Dentin bzw. in der Mundhöhle vorwiegend homofermentative Laktobazillen vor. In Untersuchungen von Kneist et al. (1987) wurden 262 stäbchenförmige Bakterienisolate aus erweichtem und hartem kariösen Restdentin gewonnen. Unter diesen Isolaten wurden 147 als Laktobazillen identifiziert. Die dominierenden Arten waren *L. rhamnosus* vor *L. plantarum* und *L. casei casei*. Botha et al. (1998) isolierten aus kariösem Dentin von 12 Patienten und aus stimuliertem Speichel von 12 kariesfreien Patienten (DMFT = 0) insgesamt 153 repräsentative Isolate von Rogosaager; 104 dieser Isolate wurden von den erkrankten und 49 von den kariesfreien Probanden gewonnen. Es handelte sich mehrheitlich auch um homofermentative Laktobazillen. Aus dem kariösen Material wurden unter den homofermentativen Arten hauptsächlich *L. paracasei* (39%), *L. rhamnosus* (31%) und *L. murinus* (16%) isoliert, und im Speichel der kariesfreien Probanden handelte es sich hauptsächlich um die homofermentativen Arten *L. rhamnosus* (41%) und *L. paracasei* (30%). *L. fermentum* - als heterofermentative Laktobazille - dominierte in beiden Probandengruppen.

Kneist et al. (1998) isolierten und differenzierten mit biochemischen und physiologischen Charakteristika neben Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten auch Laktobazillen aus dem Speichel von 60 Kindern und Jugendlichen, die über vier Jahre lang in einer Kariesrisikostudie begleitet wurden (Stößer 1998). Die Standortflora von Plaque und Speichel dieser untersuchten Kinder und Jugendlichen ist in Tabelle 19 dargestellt.

Die gewonnenen Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten wurden hinsichtlich ihrer Säureproduktion und Säuretoleranz von Bergholz (2002),

Baake (2003) und Bauer (2004) in Anlehnung an die pH-state-Technik von Birkhed (1978) untersucht. Bergholz (2002) untersuchte die Mutans-Streptokokken und konnte zeigen, dass sie bei einem niedrigen pH-Wert von 5,5 immer noch eine 30 bis 40%ige Säureproduktion aufweisen und überleben können. Eine Demineralisation der Zahnhartsubstanz durch Mutans-Streptokokken unter extrem niedrigem pH-Wert ist demnach möglich.

Tabelle 19: Standortflora der Plaque und Standortflora des Speichels bei Erfurter Kindern und Jugendlichen (Kneist et al. 1998)

Standortflora Plaque	Standortflora Speichel
<i>A. naeslundii</i>	<i>A. odontolyticus</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>S. sobrinus</i>
<i>S. oralis</i>	<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>
	<i>L. paracasei</i> ss <i>tolerans</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i>

Baake (2003) beschäftigte sich mit den am häufigsten im Speichel nachgewiesenen Laktobazillen. Die Autorin konnte eine noch höhere Säuretoleranz der von ihr untersuchten Laktobazillen im Vergleich zu den Mutans-Streptokokken aufzeigen. Die mittlere Säuretoleranz lag im Vergleich zu der der Mutans-Streptokokken um etwa eine pH-Einheit tiefer. In unversorgten Kavitäten treiben Laktobazillen die Kariesprogression voran und in tiefen, schlecht zugänglichen Fissuren könnten sie eine Karies auslösen. Okklusalfächen von Molaren und Prämolaren mit ihren mehr oder weniger tiefen Fissuren und Grübchen sind für die Besiedlung mit kariogenen Mikroorganismen wie geschaffen und neigen deshalb am häufigsten zur Ausbildung kariöser Läsionen (Loesche 1986, Steiner et al. 1994). Nach frühen Analysen von Nagano (1960) und später von Lussi und Schaffner (2002) und Lussi et al. (2003) waren Fissuren auch mehrheitlich aufgrund ihrer Morphologie einer Zahnreinigung unzugänglich (Abb. 22). Bislang konnte Michalek et al. (1981) im gnotobiotischen Tierexperiment mit Laktobazillen eine Fissurenkaries auslösen.

Auf Grund ihrer höheren Säuretoleranz im Vergleich zu Mutans-Streptokokken dürften Laktobazillen bei extrem niedrigem pH-Wert sogar überleben und weiterhin Milchsäure produzieren. Aktinomyzeten (Bauer 2004) erwiesen sich im Vergleich zu Laktobazillen und Mutans-Streptokokken am wenigsten azidogen und azidurisch (Abb. 23, 24). Die kariespräventive Wirkung der Fissurenversiegelung – also den Schutz der Fissur vor Laktobazillen und Mutans-Streptokokken – konnten Heinrich-Weltzien et al. (1998) bei den Erfurter Kindern und Jugendlichen aufzeigen.









<i>Fissuren-anatomie</i>	<i>Kariespräventiv Öffnungswinkel 70 – 90° Selbstreinigung und Hygiene möglich</i>	<i>Nicht kariespräventiv Öffnungswinkel < 70° Keine Selbstreinigung und Hygiene möglich</i>	<i>Häufigkeit</i>
V			34%
U			14%
I			19%
IK			26%
Andere			7%

Abbildung 22: Fissurenmorphologie nach Nagano (1960) (**Locus der Infektion**)

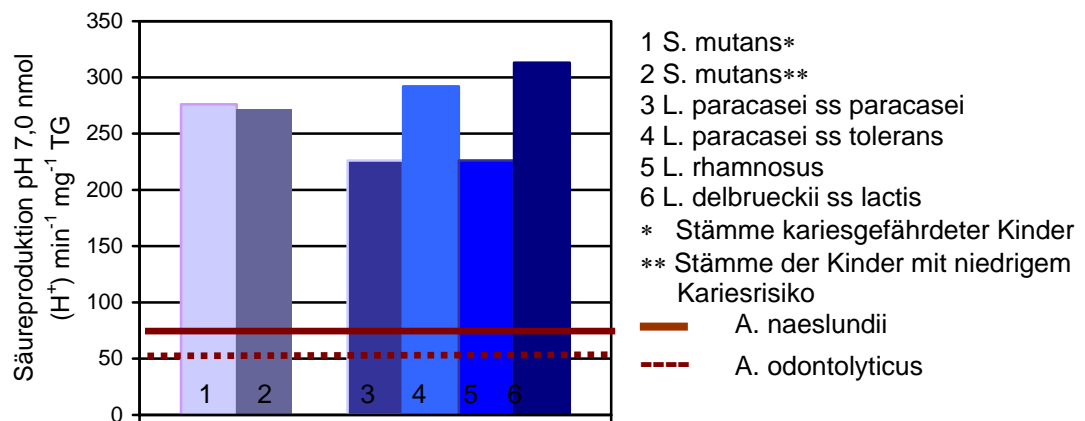


Abbildung 23: Säureproduktion von Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten in vitro (Bergholz 2002, Baake 2003, Bauer 2004)

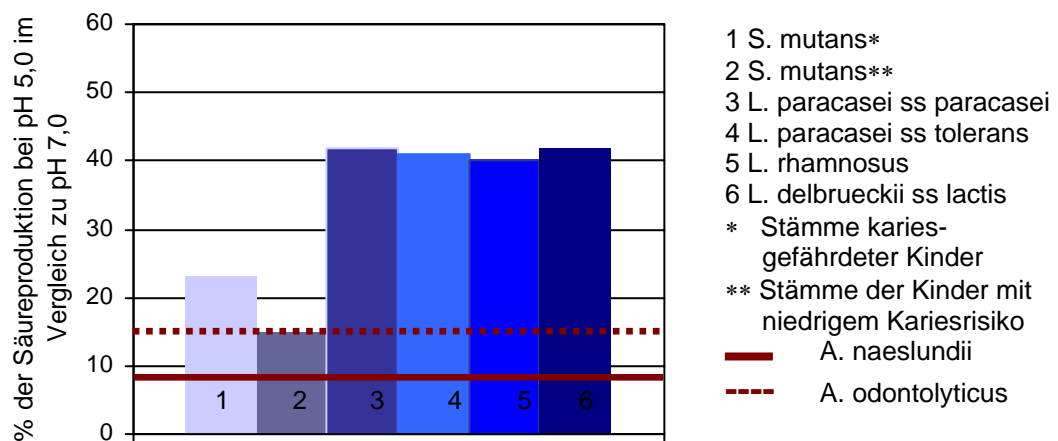


Abbildung 24: Säuretoleranz von Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten in vitro (Bergholz 2002, Baake 2003, Bauer 2004)

Die grundlegende Differenzierung zwischen homo- und heterofermentativen Laktobazillenarten kann orientierend durch ihre CO₂-Produktion und Anzucht auf dem durch McDonald et al. (1987) entwickelten homofermentativ-heterofermentativen Differentialmedium (HHD-Medium) vorgenommen werden, das die Zuordnung der zu identifizierenden Stämme in homo- oder heterofermentative Arten erlaubt (Hauer 1998). Auf Grund der unterschiedlichen Säureproduktion von homo- und heterofermentativen Laktobazillen kann durch die verschiedenen End-pH-Werte im Kulturmedium eine Unterscheidung der Kolonien anhand eines Farbinindikators in homo- oder heterofermentative Laktobazillen vorgenommen werden (Abb. 25).

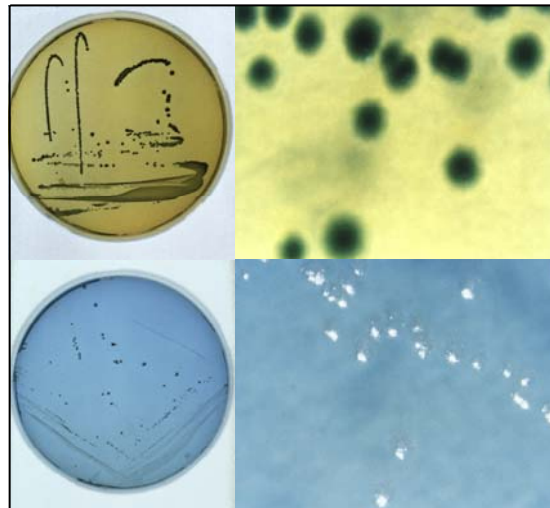


Abbildung 25: Weiße Kolonien heterofermentativer Laktobazillen und blaue Kolonien homofermentativer Laktobazillen auf homofermentativ-heterofermentativen Differentialmedium (HHD-Medium) (McDonald et al. (1987))

HHD-Bouillon, die mit homofermentativen Stämmen inokuliert ist, schlägt in einen grünen Farbton um und HHD-Bouillon, die mit heterofermentativen Stämmen inokuliert ist, schlägt in einen blauen Farbton um. Nach Überschichtung von Mischkulturen mit gleichen Anteilen von *L. brevis* und *L. plantarum* mit HHD-Agar imponierten nach dreitägiger Inkubation die homofermentativen Kolonien blaugrün und die heterofermentativen Kolonien weiß. *L. plantarum* konnte so beispielsweise zu 97% als homofermentativ und *L. brevis* nahezu mit 100% als heterofermentativ richtig identifiziert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden mit Hochdruck-Flüssigkeits-Gaschromatographie bestätigt.

Laktobazillen sind auf Grund ihrer angepassten Lebensweise und Nahrungsbedürfnisse ubiquitär verbreitet und in vielen Bereichen unseres Lebens von großer Bedeutung. So besiedeln sie neben der Mundhöhle auch den Intestinaltrakt und sorgen dort durch Produktion von Antibiotika bzw. antibiotisch wirksamen Proteinen, den Bacteriocinen, für ein ausgewogenes Ökosystem.

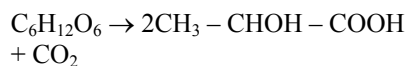
Laktobazillen werden seit Alters her als Starterkulturen im Sauerteig zur Brotherstellung eingesetzt, in der Wein- und Bierproduktion steuern sie den Gärungsprozess und Milch- und Käseproduktion sind ohne Laktobazillen undenkbar;

Sauerkraut, saure Gurken bis hin zu Oliven werden fermentiert, konserviert und darüber hinaus geschmacklich veredelt.

Unter den Laktobazillen gibt es heute in Abhängigkeit von ihrer Glukoseverstoffwechslung mehr als 50 homo- bzw. heterofermentative Arten (Brock et al. 2001) (Tab. 1). Laktobazillen produzieren vorrangig Milchsäure. Bei der Milchsäuregärung wird Glukose über Pyruvat in Milchsäure bzw. ihr Salz, das Laktat, umgewandelt (Abb. 26).

Milchsäuregärung

Homofermentativ



Heterofermentativ

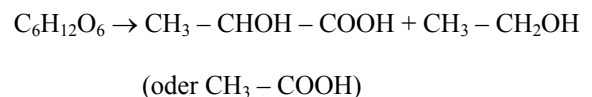


Abbildung 26: Homo- und heterofermentativer Stoffwechselweg der Laktobazillen

Milchsäure ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$) ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Stoffwechsel der Laktobazillen. Das Salz der rechtsdrehenden Milchsäure, L(+)-Laktat, ist unter anaeroben Bedingungen das Endprodukt der Glykolyse und damit gleichzeitig ein Substrat der Glukoneogenese. Bei der Fermentation durch Laktobazillen wird häufig das Razemat, d.h. die Mischung aus der D- und L-Form des Laktats erzeugt (Zeek et al. 1990).

Laktobazillen wurden bis in die Mitte des letzten Jahrhunderts auf Tomatensaftagar angezüchtet. So kultivierte auch Hadley (1933) Laktobazillen aus dem Speichel auf Tomatensaftagar. Auf Tomatensaftagar können sich aber auch Hefen, Streptokokken und gramnegative Stäbchen vermehren. 1951 entwickelten Rogosa et al. den nach dem Erstautor benannten Agar als erstes synthetisches und selektives Kulturmedium für Laktobazillen. Rogosaagar besteht zu großen Anteilen aus Azetaten und anderen Salzen, besitzt eine geringe Oberflächenspannung, hat einen niedrigen pH-Wert von 5,4 und als Zusatz den Wachstumsstimulator Tween 80 (Rogosa et al. 1951) (Abb. 27).

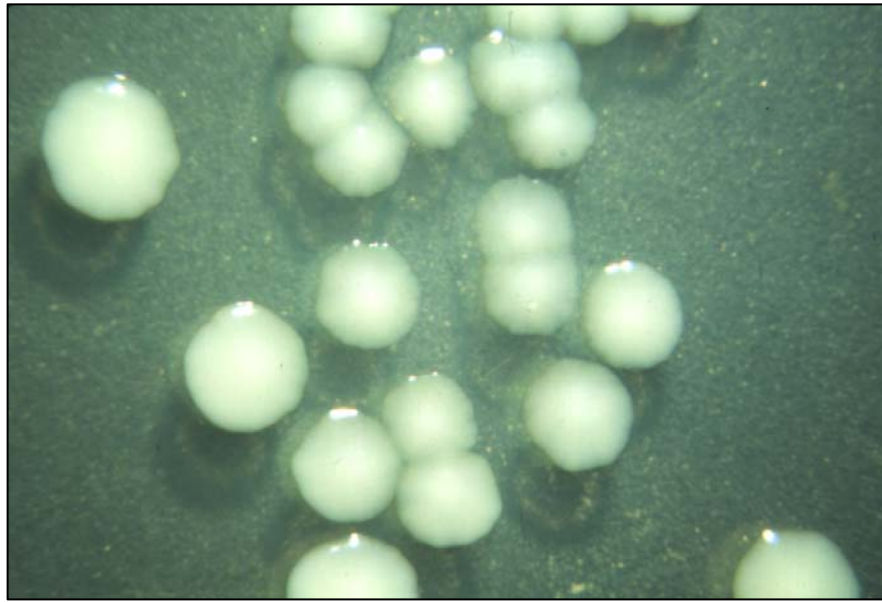


Abbildung 27: Laktobazillenkolonien auf Rogosaagar

Der niedrige pH-Wert im Rogosaagar unterdrückt das Wachstum anderer Mikroorganismen und ist dadurch selektiver für Laktobazillen; dennoch können immer noch Hefen und wenige Streptokokken auf Rogosaagar anwachsen (Kandler und Weiss 1986). Yoshizumi (1975) optimierte nachfolgend den Rogosaagar durch Zusatz von Hefeextrakt zur Wachstumsstimulation langsam wachsender Laktobazillen aus Wein.

Um aus zahnmedizinischer Sicht die Laktobazillenzahl in der oralen Flora bestimmen zu können, wurden mit Beginn der 50er Jahre verschiedene mikrobiologische Tests bzw. Kultursysteme entwickelt. Snyder (1951) entwickelte einen einfachen Test in Bouillon, mit dem die relative Anzahl an Laktobazillen im Speichel bestimmt werden sollte. Wiseman und Rogosa (1953) entwickelten die Methode von Snyder (1951) weiter, indem sie Laktobazillen semiquantitativ nach Keimzahlklassen auf Rogosaagar bestimmten. Für den Gebrauch in der zahnärztlichen Praxis wurden die Kultursysteme Dentocult[®] LB (Orion Diagnostica, Espoo, Finnland) (Larmas 1975, 1985), der Cario Check[®] LB (Hain Diagnostica, Deutschland) und der CRT[®] bacteria (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) (Abb. 28) entwickelt. Bei allen Kultursystemen werden Laktobazillen im Speichel des Patienten semiquantitativ in Keimzahlklassen bestimmt.

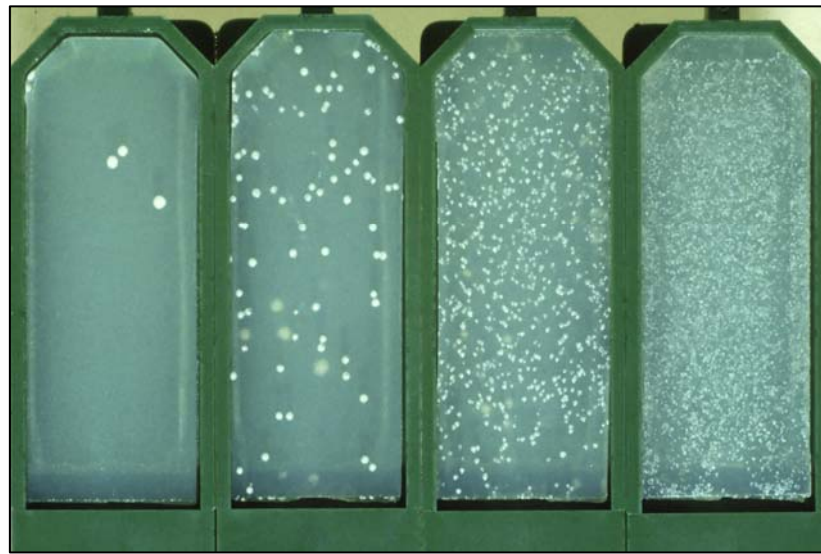


Abbildung 28: Laktobazillen-Keimzahlklassen auf dem CRT[®]bacteria (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein (von links nach rechts: Keimzahlklassen 1 bis 4, $> 10^3$ bis $\geq 10^5$ Laktobazillen pro ml Speichel)

In zahnmedizinischen Studien zum Vorkommen von Laktobazillen in Speichel, Plaque und kariösem Dentin wurde gewöhnlich keine Artbestimmung vorgenommen (Tab. 20, 21, 22). Zur Artbestimmung der Laktobazillen werden heute sowohl phänotypische Eigenschaften herangezogen als auch chemotaxonomische und phylogenetische Merkmale. Phänotypische Eigenschaften schließen die Morphologie ein - Farbe, Form und Beschaffenheit der Kolonie, Gestalt, Form und Größe der Zellen - und ihre biochemischen und physiologischen Leistungen, ihr Verhalten gegenüber Sauerstoff, Temperatur und pH-Wert (Drews 1983). Eine zunehmende phylogentisch basierte Identifizierung verwendet spezifische DNA Proben bzw. Sequenzanalysen von Oligonukleotiden der 16S ribosomalen RNA (Tannok 1999). Fortschritte in der molekularen Technik führten dazu, dass die Methode der reversen Transkriptase durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ersetzt wurde. Mit der PCR-Technik wird ein artspezifisch konservierter bakterieller Abschnitt der 16S-rRNA nachgewiesen. Rupf et al. (1999) bestimmten mit kompetitiver Polymerasekettenreaktion (PCR) die Keimzahl von *Streptococcus mutans* im Speichel.

Song et al. (2000) zeigten, dass die multiplex PCR eine einfache Methode zur Identifikation von intestinalen Laktobazillenstämmen ist. Auch Gevers et al. (2001) identifizierten Laktobazillen mittels PCR bis zur Subspeziesebene. Durch spezies-spezifische PCR-Techniken gelang es weiterhin, die beiden humanpathogenen Mutans-Streptokokken *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* - nicht nur phänotypisch sondern auch genotypisch voneinander abzugrenzen (Rupf et al. 2005). Weitere, neue Techniken zum Nachweis von Laktobazillen sind in Tabelle 23 aufgeführt. Ebenso sind die „randomly amplified polymorphic DNA Methode“ (RAPD) und die Restriktionsendonukleaseanalyse (REA), bei der ein Bandmuster oder Fingerabdruck für die Identifizierung des jeweiligen Stammes gebildet wird, sowie die „soluble protein patterns“ Methode weitere Verfahren zur Identifizierung von Bakterien (Salminen und von Wright 1998).

Als chemotaxonomisches Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen hat sich in den letzten 22 Jahren in Laboreinrichtungen weltweit auch die Analyse von zellulären Fettsäuren als eine Hilfe zur schnellen Identifizierung und Klassifizierung von Mikroorganismen durchgesetzt und etabliert. Die Gaschromatographie spielt als eine analytische Methode für die Fettsäureanalyse eine wichtige Rolle. Die Gaschromatographie allgemein ist ein Verfahren der Chromatographie, bei dem gasförmige oder unzersetzt verdampfbare Probensubstanzen mittels gasförmiger mobiler Phase (Trägergas) an einer flüssigen oder festen stationären Phase separiert werden (Schlee und Kleber 1991). In Verbindung mit dem Gaschromatograph ist das Sherlock Microbial Identification System (MIS) ein spezielles Anwendungssystem, bei dem mit Hilfe von Membranfettsäurespektren bekannter Bakterienarten in einer Bibliothek die Membranfettsäurespektren zu identifizierender Bakterien verglichen werden (Moore 1995). Voraussetzung dafür sind Reinkulturen am Ende ihrer logarithmischen Wachstumsphase, deren Membranfettsäurespektrum mit denen von Referenzstämmen verglichen wird, die in der Datenbank des MIDI-Systems hinterlegt sind; zur Zeit sind in der Datenbank die Membranfettsäuremuster von 91 Laktobazillen vorhanden (Anhang, Tab. 31). Dem Nutzer werden nach Vergleich des Membranfettsäurespektrums des zu identifizierenden Stammes mit den Bibliotheksdaten drei bis fünf Taxa zur Entscheidungsfindung angeboten. Zwei Indizes, der „Similarity Index“ (SI) und die „Euklid Distanz“ (ED), werden zur Qualitätskontrolle herangezogen. Eine große Übereinstimmung des gesuchten Stammes mit den in der Datenbank hinterlegten Mikroorganismen liegt dann vor, wenn der SI

zwischen 0.6 und 1.0 liegt. In Abbildung 29 ist dies in einer zweidimensionalen Darstellung am Beispiel von *Erwinia*, *Salmonella* und *Serratia* graphisch veranschaulicht. Ein SI von ≥ 0.3 sagt jedoch aus, dass der Keim zwar nicht in der Bibliothek enthalten ist, aber doch noch eine große Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen Taxon besitzt. Die Keimverwandtschaft wird durch die Euklid'sche Distanz dargestellt; das heißt, bei einer ED von 2 liegt der ausgewiesene Stamm vor. Um die gleiche Subspezies handelt es sich bei einer ED von < 6 , und eine ED von < 10 bedeutet, dass es sich um die gleiche Art und bei < 25 um die gleiche Gattung handelt. Das angebotene Taxon mit der niedrigsten ED und dem höchsten SI wird als wahrscheinlichstes Ergebnis vorgeschlagen (Abb. 29).

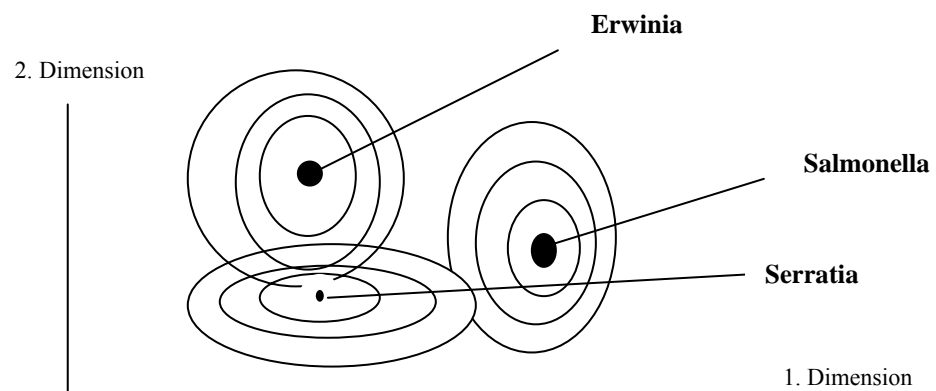


Abbildung 29: Zweidimensionale Darstellung von Membranfettsäurespektren unterschiedlicher Gattungen, die einen Similarity Index (SI) > 0.5 nach der Datenbankanalyse aufweisen

Die Nutzung von Membranfettsäurespektren in der Chemotaxonomie setzt eine Anzucht der Keime bei konstant gehaltenen Temperaturen voraus. Dies wurde in der vorliegenden Untersuchung zur Charakterisierung der 20 Laktobazillenstämme (Tab. 5) der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen strikt eingehalten und ebenso die temperaturabhängigen Arbeitsschritte der Verseifung und Methylation. Die Stämme wurden bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ angezüchtet, die Verseifung der Biomasse wurde konstant bei 100°C vorgenommen und die Methylierung konstant bei 80°C . Es wurden 10fach-Bestimmungen sowohl nach jeweils 24- und 48stündiger Anzucht der Stämme unter anaeroben Bedingungen vorgenommen. Die Datenbank basiert auf 91 Laktobazillenarten und enthält auch die Membranfettsäureprofile der hier einbezogenen Arten (Tab. 24, 25, 26) (Moore 1995).

Tabelle 24: Membranfettsäurespektrum obligat homofermentativer Laktobazillen (MOORE 3.8, PYGT)

Index Nr.	Fettsäure (Name)	(% Gehalt der Fettsäuren)				
		LACTOBACILLUS				
		sharpeae	delbrueckii ss	acidophilus	salivarius ss	
		delbrueckii	lactis	bulgaricus	salivarius	
4	10:0 FAME			1,54		
11	12:0 FAME			0,86		
19	14:0 FAME	2,40	4,46	2,23	3,05	2,52
27	15:0 FAME					5,51
						0,62
33	16:1 CIS 9 FAME	5,79	7,65	12,20	7,11	2,25
35	16:0 FAME	30,24	10,04	25,47	7,82	36,08
42	17:0 ANTEISO	0,42				
	FAME					0,57
57	18:1 CIS 9 FAME	41,73	46,03	24,15	49,92	26,96
60	18:0 FAME	4,30	2,25	3,71	3,69	3,18
70	19 CYC 9,10/:1		17,88	3,43	14,84	5,66
	FAME					10,80
71	19 CYC 11,12/:1			4,38		
	FAME					
77	20:1c13/t11 FAME			1,71		
87			1,07		0,72	
	SUMMED FEATURE#8					
89	SUMMED FEAT#10	15,50	8,11	21,95	9,53	21,33
						4,55

Tabelle 25: Beispiele für Membranfettsäurespektrum fakultativ homofermentativer Laktobazillen (MOORE 3.8, PYGT)

Index Nr.	Fettsäure (Name)	(% Gehalt der Fettsäuren)				
		LACTOBACILLUS				
		casei ss	paracasei	paracasei	tolerans	plantarum rhamnosus
19	14:0 FAME	4,37	4,60	6,07	3,03	3,87
33	16:1 CIS9 FAME	6,44	6,31	7,60	5,22	3,78
35	16:0 FAME	14,59	16,06	17,75	28,24	26,32
42	17:0 ANTEISO FAME			0,66		
57	18:1 CIS9 FAME	41,98	32,76	35,71	19,26	29,89
60	18:0 FAME	4,95	4,08	4,32	5,73	4,18
70	19 CYC9,10/:1 FAME	17,31	24,01	18,83	22,58	17,95
71	19 CYC11,12/:1 FAME				1,52	
89	SUMMED FEAT.#10	10,37	10,17	7,73	13,64	13,17

Tabelle 26: Membranfettsäurespektrum heterofermentativer Laktobazillen (MOORE 3.8, PYGT)

Index Nr.	Fettsäure (Name)	(% Gehalt der Fettsäuren)				
		LACTOBACILLUS				
		brevis	buchneri	fermentum	reuteri	viridescens
19	14:0 FAME	4,93	3,98	2,83	6,47	1,95
33	16:1 CIS9 FAME	2,79	6,56	2,73	5,74	5,35
35	16:0 FAME	30,03	20,84	33,49	27,67	9,11
57	18:1 CIS9 FAME	17,70	13,73	22,64	25,35	71,98
60	18:0 FAME	7,55	4,67	3,12	7,72	2,57
70	19 CYC9,10/:1 FAME	27,08	37,80	20,98	16,42	
76	CIS 11 FAME					0,49
78	18:0 12OH	2,43	10,17	7,73	13,64	13,17
87	SUMMED FEATURE#8					0,66
89	SUMMED FEATURE#10	5,29	11,22	13,70	9,16	7,29

Die chemotaxonomische Identifizierung dieser Stämme mit Hilfe des Microbial Identification System erwies sich allerdings als unbefriedigend (Abb. 3), da nur vier Stämme (*L. coryniformis* ss *torquens*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. reuteri*, *L. paracasei* ss *paracasei*) sowohl nach 24- als auch nach 48stündiger Anzucht korrekt bestätigt wurden; ein weiterer Stamm (*L. buchneri*) wurde nur nach 24stündiger und zwei weitere (*L. brevis*, *L. acidophilus*) nur nach 48stündiger Anzucht chemotaxonomisch korrekt bestätigt.

Insgesamt 7 Stämme (*L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. casei* ss *rhamnosus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. zeae*, *L. alimentarius*) wurden nach beiden Anzuchtverfahren zwar nicht in Übereinstimmung zur DSMZ eingeordnet, wohl aber gleich als andere Art. Bei sechs Stämmen (*L. paracasei* ss *tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* ss *delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*) stimmte die Identifizierung nicht mit der in der DSMZ geführten Artbezeichnung überein. Entgegen den Erwartungen wurde letztlich nur ein Drittel der Stämme mit ausreichenden Qualitätsstandards, dem Similarity Index und der Euklid Distanz (Tab. 9, Abb. 4, 5, 6, 7), identifiziert. Die taxonomische Zuordnung der vorliegenden Laktobazillenstämme auf genetischer Basis konnte demgegenüber parallel von Wicht (persönliche Mitteilung) vorgenommen werden.

Das Ziel weiterführender Studien sollte es sein, mit den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Referenzstämmen eine neue Bibliothek für Laktobazillen zu erarbeiten. Das MIDI-System lässt die Erstellung neuer Datenbanken zu. Ob dabei die von Hauer (1998) empfohlene 24stündige Anzucht der Laktobazillenstämme einer 48stündigen Anzucht zur Bestimmung des Membranfettsäuremusters vorzuziehen ist, muss dabei überprüft werden. In der vorliegenden Studie konnte nach 48stündiger Bebrütungszeit im Vergleich zur 24stündigen nur ein Stamm mehr korrekt identifiziert werden.

Neben Säureproduktion und Säuretoleranz zählt auch die Bacteriocinogenität zu den Virulenzeigenschaften kariogener Keime. Bacteriocine sind seit über 100 Jahren bekannt (Brandis 1975) und durch ihre Bacteriocinproduktion behaupten sich Bakterien gegenüber anderen im Biofilm. Für die Bacteriocintestung wurden im Laufe der Zeit verschiedene Methoden entwickelt. Die Methode nach Fredericq (1948) ermöglicht noch heute eine gute Beurteilung der Bacteriocinogenität. Bei dieser Methode werden die Teststämmen auf einem festen Medium mit den zu untersuchenden Indikatorstämmen überschichtet (Abb.1). Als Zeichen der Bacteriocinogenität bildet sich im

Indikatorstammrasen ein Hemmhof über der Makrokolonie aus (Abb. 2). Abbott und Shannon (1958) verimpften die Stämme strichförmig. Das dadurch entstehende Hemmbild ist jedoch nur unzureichend beurteilbar. Lediglich eine ja/nein Entscheidung erlaubt die Lakunentechnik nach Ozeki (1959), bei der Test- und Indikatorstamm im gleichen Nährmedium angezüchtet werden. Nicolle und Prunet (1964) führten die Methode des tiefen Impfstiches ein. Die Auswertung erwies sich jedoch als schwierig. Die Doppelschichtagarmethode wurde von van Loveren et al. (1999, 2000), Merte et al. (2004), Scharff (2004) und Scharff (2005) erfolgreich bei der Untersuchung von Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten angewandt und fand auch in der vorliegenden Untersuchung zur Beurteilung der Bacteriocinogenität von Laktobazillen Verwendung. Scharff (2004) testete Mutans- und orale Streptokokken, die in der schon erwähnten Erfurter Kariesrisikostudie gewonnen wurden (Kneist et al. 1998), gegen Stämme der gleichen Art und gegenüber oralen Streptokokken und konnte die Annahme, dass die Stämme mehrheitlich bacteriocinogen sind, bestätigen. Mutans-Streptokokken waren dabei häufiger bacteriocinogen als Nicht-Mutans-Streptokokken. Darauf folgend befasste sich Scharff (2005) mit der Bacteriocinogenität der Aktinomyzeten aus der Grundgesamtheit der Stämme der Erfurter Kinder und Jugendlichen. Die Bacteriocinogenität innerhalb der eigenen Art war stärker ausgeprägt im Vergleich gegenüber Laktobazillen und Streptokokken. Im Ergebnis der Untersuchungen von Scharff (2004) und Scharff (2005) konnte die ökologische Bedeutung der Bacteriocinproduktion untermauert werden. In den vorangegangenen Untersuchungen fehlte jedoch die Betrachtung der Laktobazillen hinsichtlich ihrer Bacteriocinproduktion und deren möglicher ökologischer Bedeutung. Mit der vorliegenden Studie wurde der Studienkomplex durch die Bacteriocinogenität oraler und nicht oraler Laktobazillen gegen Mutans- und Nicht-Mutans-Streptokokken ergänzt. 13 Stämme erwiesen sich als bacteriocinogen (Tab. 10). In der Literatur berichteten Silva et al. (1987) von einer antibiotischen Aktivität von *Lactobacillus spec. GG*. Anaerobe Bakterien, Enterobakterien, Pseudomonaden, Staphylokokken und Streptokokken konnten in ihrem Wachstum inhibiert werden. Laktobazillen selbst wurden nicht gehemmt. Es handelte sich allerdings um ein hitzestabiles und gegenüber verschiedenen Proteasen resistentes Microcin mit einem niedrigen Molekulargewicht von $< 1,000$ Da.

James und Tagg (1988) beschrieben die Fähigkeit der Gattungen *Streptococcus*, *Enterococcus* und *Lactobacillus* wirksame Bacteriocine gegen *S. mutans* zu bilden.

Bei den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Laktobazillen handelte es sich nicht um die Laktobazillen von Kindern und Jugendlichen der Erfurter Kariesrisikostudie, sondern zunächst um 20 Referenzstämme der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, die auch für die taxonomischen Untersuchungen herangezogen wurden.

Bei diesen Stämmen handelte es sich sowohl um orale Laktobazillen (*L. salivarius* ss *salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. paracasei* ss *rhamnosus*, *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. delbrueckii* ss *delbrueckii*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. buchneri*, *L. coryniformis* ss *torquens*) als auch um ubiquitär verbreitete Laktobazillen (*L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. reuteri*, *L. alimentarius*, *L. zeae*). Die Referenzstämme oraler Laktobazillen waren von besonderem Interesse für die Bacteriocinogenitätsuntersuchungen. Die nicht oralen Laktobazillenarten wurden in die Untersuchung mit einbezogen, da sie sich darüber hinaus für die parallele Überprüfung der Datenbank des Microbial Identification Systems (MIDI, Newark, USA) anboten. Als Indikatorstämme wurden sowohl Mutans- als auch Nicht-Mutans-Streptokokken einbezogen (Tab. 6).

13 der 20 ausgewählten Laktobazillenstämme (*L. plantarum*, *L. salivarius* ss *salivarius*, *L. casei*, *L. zeae*, *L. reuteri*, *L. buchneri*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. coryniformis* ss *torquens*, *L. rhamnosus*, *L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus*, *L. alimentarius*) erwiesen sich gegenüber den Indikatorstämmen als bacteriocinogen (Tab. 10). Mit einer Bacteriocinogenität von je 85% zeichneten sich die Stämme *L. salivarius* ss *salivarius* und *L. plantarum* als stärkste Bacteriocinbildner aus (Abb. 17).

Im Schrifttum berichteten Suma et al. (1998) von bacteriocinähnlichen Substanzen bei *L. plantarum*. Klaenhammer (1988) gewannen von *L. plantarum* das Bacteriocin „Plantaricin A“. Elegado et al. (2004) zeigten die Bacteriocinogenität von *L. plantarum* gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* auf. Kawai et al. (2004) konnten ebenfalls eine Bacteriocinbildung bei *L. reuteri* nachweisen. Demgegenüber waren die Stämme *L. coryniformis* ss *coryniformis*, *L. delbrueckii* ss *lactis*, *L. delbrueckii* ss *bulgaricus* und *L. alimentarius* mit nur 7% die schwächsten Bacteriocinbildner (Abb. 17).

Im Vergleich zum Schrifttum wurden in der vorliegenden Untersuchung auch diskordante Ergebnisse aufgefunden. So beschrieben Zamfir et al. (1999) das Bacteriocin „Acidophilin 801“ von *L. acidophilus* IBB 801. Tahara et al. (1997)

konnten ebenso bei Stämmen von *L. acidophilus* Bacteriocine isolieren. Kawai et al. (1998) beschrieben „Gassericin A“, ein von *L. gasseri* gebildetes Bacteriocin. Der vorliegende in die Studie einbezogene Stamm *L. acidophilus* DSMZ 20079 bildete keine Bacteriocine. Die durch die Bacteriocine der hier untersuchten Laktobazillen gebildeten Hemmhöfe beliefen sich zwischen 10 und 20,5 mm (Abb. 18). Die Hypothese, dass Laktobazillen - insbesondere orale Laktobazillen - mehrheitlich bacteriocinogen sind, konnte untermauert werden. Alle Serotypen von *S. mutans* (Abb. 8, Tab. 11), der Serotyp d von *S. sobrinus* (Abb. 9, Tab. 12), *S. sanguis* (Abb. 10, 11, Tab. 13), *S. oralis* (Abb. 12, 13, Tab. 14), *S. mitis* (Abb. 14, Tab. 15), *S. gordonii* (Abb. 15, Tab. 16) und *S. salivarius* (Abb. 16, Tab. 17) wurden in ihrem Wachstum inhibiert. Mit 40% war der Stamm *S. mutans* (e) LM7 am sensibelsten. Insgesamt gesehen waren die gebildeten Bacteriocine der Laktobazillen aber mehrheitlich gegen Nicht-Mutans-Streptokokken gerichtet (Abb 19, 20, Tab 18). Somit konnte die Hypothese, dass Unterschiede in der Sensitivität zwischen Mutans- und Nicht-Mutans-Streptokokken bestehen, bestätigt werden. Weiterführende Informationen dazu konnten im Schrifttum nicht aufgefunden werden. In vitro konnte mit der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Laktobazillen in der Lage sind, gegen Mutans- und Nicht-Mutans-Streptokokken gerichtete Bacteriocine zu bilden und in ihrem Wachstum zu hemmen. In vivo haben aber Laktobazillen und Streptokokken bevorzugte Lebensräume. Laktobazillen sind Schleimhaut- und Speichelkeime und sind im kariös erweichten Dentin zu finden (Edwardsson 1974, Heinrich und Kneist 1986), wogegen Streptokokken zunächst in der Plaque ihren Standort haben und später auch im kariösen Dentin etabliert sind. Laktobazillen im Speichel (Tab. 20) sind gegenüber der Speichelstreptokokke *S. salivarius* zwar bacteriocinogen aber eine größere Bedeutung dürfte ihre Bacteriocinogenität in der Kavität haben, in der sie zumindest im erweichten Dentin dominieren (Heinrich und Kneist 1986). Die in dieser Studie in vitro aufgefundenen 10 Hemmpprofile machen deutlich, dass die Bacteriocine der Laktobazillen sich mehrheitlich gegen Nicht-Mutans-Streptokokken richten. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse wäre es von besonderem Interesse, mit gleichartigen Untersuchungen die Bacteriocinogenität der aus dem Speichel Erfurter Kinder und Jugendlicher isolierten Laktobazillen zu überprüfen, um sich der in vivo Situation zu nähern. Die Wechselwirkungen zwischen den Keimgruppen in Plaque und Speichel (Tab. 20, 21) könnten dann komplex dargestellt werden und neue Erkenntnisse vermitteln.

Tabelle 20: Ausgewählte Studien mit ihrem methodischen Vorgehen zum Nachweis von Laktobazillen aus dem Speichel (Auszug Baake 2003)

Autor (Jahr)	Probandenalter	Stichprobenumfang (n)	Kulturmedium	Identifikationsmethode
Hadley (1933)	9 bis 16	24	Tomatensaftagar (pH 5,0)	makroskopisch
Becks (1944)	18 bis 22	1250	Tomatensaftagar (pH 5,0)	makroskopisch
Glass (1952)	7 bis 14	351	Tomatensaftagar	morphologisch, Gramfärbung
Green et al. (1957)	6 bis 14	339	Rogosaagar	morphologisch, Gramfärbung
Kesel (1958)	25	5	Tomatensaft- und Rogosaagar	makroskopisch
Klock und Krasse (1977)	9 bis 12	655	Rogosaagar	makroskopisch
Köhler und Bratthall (1978)	4,5 bis 5	36	Rogosaagar	Immunfluoreszenz
Crossner (1981)	14	115	Dentocult LB	morphologisch, Gramfärbung
Arneberg et al. (1984)	11 bis 15	9	Rogosaagar	makroskopisch
Köhler et al. (1984)	3. Mon. – 4. J. und Mütter	77	Rogosaagar	Immunfluoreszenz
Disney et al. (1992)	6 bis 12	5233	Bactotest (Cariesscreen)	makroskopisch
Nancy und Dorignac (1992)	5 bis 15	66	Rogosaagar	biochemisch, Api
Alaluusua (1993)	12 bis 17	122	Dentocult LB	makroskopisch
Oncag et al. (2000)	2-14	33	Dentocult LB	makroskopisch
Smith et al. (2001)		72		biochemisch
Koll-Klais et al. (2004)	12		Dentocult LB	makroskopisch

Tabelle 21: Ausgewählte Studien mit ihrem methodischen Vorgehen zum Nachweis von Laktobazillen aus der Plaque (Auszug Baake 2003)

Autor (Jahr)	Probandenalter	Stichprobenumfang (n)	Kulturmedium	Identifikationsmethode
Steinle et al. (1967)	6 bis 16	33	Rogosaagar	makroskopisch
Ikeda et al. (1973)	7 bis 9	25	Rogosaagar	morphologisch, Gramfärbung,
Mundorff et al. (1990)	12 bis 15	120	Rogosaagar	biochemisch
Nancy und Dorignac (1992)	5 bis 15	66	Rogosaagar	biochemisch
Borgstrom et al. (1997)	14 bis 15	60	Rogosaagar	makroskopisch
Smith et al. (2001)		98		biochemisch
Krishnakumar et al. (2002)		10/Gruppe	Rogosaagar	makroskopisch
Turksel Dulgergil et al. (2004)	2 bis 18 Monate	27 Mutter/Kind Paare	Rogosaagar	makroskopisch

Tabelle 22: Ausgewählte Studien mit ihrem methodischen Vorgehen zum Nachweis von Laktobazillen aus kariösem Dentin (Auszug Baake 2003)

Autor (Jahr)	Probandenalter	Stichprobenumfang (n)	Kulturmedium	Identifikationsmethode
Shovlin und Gillis (1969)		25	Hirn-Herz-Blutagar	biochemisch
Duchin und van Houte (1978)	6/7 bis 12	2 x 5	Rogosaagar	morphologisch, Gramfärbung
Heinrich und Kneist (1986)	6 bis 7	70	Hirn-Herz-Blutagar	biochemisch
Nancy und Dorignac (1992)	5 bis 15	66	Rogosaagar	biochemisch
Botha et al. (1998)				biochemisch
Botha et al. (2001)	I: 3 bis 6; II: 9			biochemisch

Tabelle 23: Ausgewählte aktuelle Studien zum Nachweis von Laktobazillen

Autor (Jahr)	Identifikationsmethode
Lortal et al. 1997	Bestimmung von Electrophorese Mustern von Peptidoglycanhydrolasen
Tannok 1999	Sequenzanalysen von Oligonukleotiden der 16S rRNA
Song et al. 2000	Multiplex-PCR
Andrighetto et al. 2001	RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction)
Gevers et al. 2001	PCR
Dubernet et al. 2002	PCR
Leblanc et al. 2002	Fluoreszenzmessungen
Du Toit et al. 2003	RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction)
Rachman et al. 2003	PCR
Massi et al. 2004	PCR
Lee et al. 2004	multiplexe PCR-basierende Restriktionsenzymanalyse
Oust et al. 2004	FT-IR (Fourier Transform Infrared spectroscopy)
Theunissen et al. 2005	PCR-basierende DGGE Analyse
Delfederico et al. 2006	RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction)
Catzeddu et al. 2006	RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction)

7 Schlussfolgerung

Laktobazillen sind Schleimhautparasiten und Speichelkeime. Nach Kneist et al. (1998, 1999) und Stöber (1998) konnten 18 verschiedene Laktobazillenarten aus dem Speichel von Erfurter Kindern isoliert werden. Die dominantesten Arten waren *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* ss *lactis* und *L. casei*. In dieser Studie wurden 20 orale als auch nicht orale Laktobazillenstämme der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) zur Untersuchung herangezogen. Die Laktobazillen wurden mit dem Microbial Identification System (MIDI, Newark, USA) chemotaxonomisch mittels ihres Membranfettsäuremusters identifiziert. Das Ergebnis war jedoch nicht befriedigend, da nur ein Drittel der Stämme korrekt bestimmt werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass für die hier verwendete chemotaxonomische Identifizierung der Laktobazillen weiterführend die Erstellung einer neuen Datenbank für Laktobazillen unerlässlich ist. Im zweiten Teil der Untersuchung wurden die gleichen 20 Laktobazillenstämme hinsichtlich ihrer Bacteriocinogenität gegenüber 14 Mutans- und Nicht-Mutans-Streptokokken getestet. 13 Laktobazillenstämme erwiesen sich als bacteriocinogen. Die Serotypen c, e und f von *Streptococcus mutans* konnten in ihrer Gesamtheit in ihrem Wachstum inhibiert werden. Eine Ausnahme bildete *S. sobrinus*, Serotyp g, der immun war. Die Nicht-Mutans-Streptokokken mit *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* und *S. salivarius* erwiesen sich alle als sensibel gegenüber den gebildeten Bacteriocinen. Da in vitro Mutans- und Nicht-Mutans-Streptokokken von den Laktobazillen in ihrem Wachstum unterdrückt wurden (Tab.18), könnte angenommen werden, dass den Bacteriocinen der Laktobazillen auch in vivo eine ökologische Bedeutung in der Mundhöhle zukommt. Um dies zu untermauern, könnte weiterführend der Bacteriocinogenität der Laktobazillen der Erfurter Kinder und Jugendlichen nachgegangen werden, die bereits von Baake (2003) hinsichtlich ihrer Säureproduktion- und -toleranz untersucht wurden.

8 Literaturverzeichnis

1. Abbott F. 1879. Wirkung der Gärungsproduktion auf verschiedene Gebiete der Mundhöhle. In: Miller WD, Hrsg. Mikroorganismen der Mundhöhle. Zweite Auflage. Leipzig: Thieme Verlag, 112-131.
2. Abbott JD, Shannon R. 1958. A method for typing *Shigella sonnei*, using colicine production as a marker. *J Clin Pathol*, 11(1):71-77.
3. Alaluusa S, Nuström M, Grönroos L, Peck L. 1989. Caries-related microbiological findings in a group of teenagers and their parents. *Caries Res*, 23:49-54.
4. Alaluusua S. 1993. Salivary counts of *S. mutans* and *Lactobacilli* and past caries experience in caries prediction. *Caries Res*, 27:68-71.
5. Andrighetto C, Zampese L, Lombardi A. 2001. RAPD-PCR characterization of *lactobacilli* isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Lett Appl Microbiol*, 33(1):26-30.
6. Arneberg P, Ögaard B, Scheie AA, Rølla G. 1984. Selections of *S. mutans* and *Lactobacilli* in an Intra-oral Human Caries Model. *J Dent Res*, 63:1197-1200.
7. Aso Y und Akazan H. 1992. BLP Study Group: Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on a recurrence of superficial bladder cancer. *Urol Int*, 49:125-129.
8. Baake K. 2003. Zur Säureproduktion und Säuretoleranz ausgewählter oraler Laktobazillen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
9. Back W. 1988. Biological acidification. *Monatszeitschrift für Brauwissenschaft*, 4:152-156.

10. Barefoot SF, Klaenhammer TR. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl and Environ Microbiol*, 6:1808-1815.
11. Barefoot SF, Klaenhammer TR. 1984. Purifikation and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimikrob Agents Chemother*, 26:328-334.
12. Bauer H. 2004. Säureproduktion und Säuretoleranz oraler Aktinomyceten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
13. Becks H, Jensen AL, Millarr CB. 1944. Rampant dental caries: Prevention and prognosis – A five year clinical survey. *J Am Dent Assoc*, 31:1189-1200.
14. Bennet PM, Richmond MH. 1978. The bacteria: Plasmids and their possible influence on bacterial evolution. New York: Academic Press.
15. Bergholz T. 2002. Säureproduktion und Säuretoleranz bei humanen Stämmen von *Streptococcus mutans* [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
16. Birkhed D. 1978. Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohols in small samples of dental plaque material. *Caries Res*, 12:128-136.
17. Black GV. 1886. Gelantine forming microorganisms. *Indep Pract*, 546-562.
18. Black GV. 1914. *Konservierende Zahnheilkunde*. Berlin: Meusser Verlag.
19. Böcker G, Hammes WP. 1990. *Lactobacillus sanfrancisco* in a commercial sour dough starter preparation. *Food Biotechnol*, 4:475.
20. Bonade A, Murelli F, Vescovo M, Scolari G. 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Lett Appl Microbiol*, 30(2):153-158.

21. Borgstrom MK, Sullivan A, Granath L, Nilsson G. 1997. On the pH-lowering potential of lactobacilli and mutans streptococci from dental plaque related to the prevalence of caries. *Community Dent Oral Epidemiol*, 25(2):165-169.
22. Botha FS, Botha SJ, Kroon J, Steyn PL. 2001. Caries prediction factors in children with primary dentition [Abstract]. Centre for Stomatological Research, Faculty of Dentistry, University of Pretoria.
23. Botha SJ, Boy SC, Botha FS and Senekal R. 1998. *Lactobacillus* species associated with active caries lesions. *J D.A.S.A.*, 53:3-6.
24. Brandis H, Smarda J. 1971. Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
25. Brandis H. 1975. Die Natur der Bacteriocine. *Naturwiss*, 62:22-28.
26. Bridgeman. 1863. Wirkung der Gärungsproduktion auf verschiedene Gebiete der Mundhöhle. In: Miller WD, Hrsg. *Mikroorganismen der Mundhöhle*. Zweite Auflage. Leipzig: Thieme Verlag, 112-131.
27. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2001. *Mikrobiologie*. Berlin: Akad Verlag, 348- 363.
28. Buckenhüskes H, Schneider M, Hammes WP. 1986. Die milchsäure Vergärung pflanzlicher Rohware unter besonderer Berücksichtigung der Herstellung von Sauerkraut. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm*, 10:42-53.
29. Carlsson J, Grahnén H, Johnsson G. 1975. Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. *Caries Res*, 9:333-339.
30. Catzeddu P, Mura E, Parente E, Sanna M, Farris GA. 2006. Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. *Syst Appl Microbiol*, 29(2):138-144.

31. Clarke JK. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol*, 5: 141-147.
32. Conway R. 1988. Lactobacilli: Fact and Fiction. In: Grubb R, Midtvedt T, Norin E, Hrsg. The regulatory and protective role of the normal microflora. Stockton Press, 263-282.
33. Crossner CG. 1981. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. *Comm Dent oral Epidemiol*, 9:182-190.
34. De Klerk HC. 1967. Bacteriocinogeny in *Lactobacillus fermenti*. *Nature*, 2:14:609.
35. Delfederico L, Hollmann A, Martinez M, Iglesias NG, De Antoni G, Semorile L. 2006. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *J Dairy Res*, 73(1):20-27.
36. Dembele T, Obdrzalek V, Votava M. 1998. Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zentralbl Bakteriol*, 288(3):395-401.
37. De Orduña RM, Patchett ML, Liu S-Qu, Pilone GJ. 2001. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Appl Environ Microbiol*, 67:1657-1662.
38. De Vrese M, Schezenmeir J. 1998. Prä- und Probiotika - Stand der Diskussion. *Ernährungsumschau*, 45:79-89.
39. Disney JA, Abernathy JR, Graves RC, Stamm JW, Bohannon HM, Zack DD. 1992. The University of North Carolina Caries Risk Assessment study: further developments in caries risk prediction. *Community Dent Oral Epidemiol*, 20:64-75.

-
40. Drews G. 1983. Mikrobiologisches Praktikum. Vierte Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
 41. Dubach A. 2001. Das probiotische Milchsäurebakterium *Lactobacillus* GG. Sonderdruck aus Schweizerischer Zeitschrift GanzheitsMedizin 13(1): 41-45;13(2):101-106.
 42. Dubernet S, Desmasures N, Gueguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiol Lett, 214(2):271-275.
 42. Duchin S, van Houte J. 1978. Relationship of *S. mutans* and Lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man. Arch Oral Biol, 23:779-786.
 43. Du Toit M, Dicks LM, Holzapfel WH. 2003. Identification of heterofermentative lactobacilli isolated from pig faeces by numerical analysis of total soluble cell protein patterns and RAPD-PCR. Lett Appl Microbiol, 37(1):12-16.
 44. Edwardsson S. 1974. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. Odontol Revy, 25:(32):1-143.
 45. Elegado FB, Guerra MA, Macayan RA, Mendoza HA, Lirazan MB. 2004. Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. Int J Food Microbiol, 95(1):11-18.
 46. Farmer RE, Shahani KM, Reddy GV. 1975. Inhibitory effect of yoghurt components. J Dairy Sci, 58:787.
 47. Farrow JAE, Phillips Brian A, Collins MD. 1986. Nucleic acid studies on some heterofermentative lactobacilli: Description of *Lactobacillus malefermentans* sp. nov. and *Lactobacillus parabuchneri* sp. nov. FEMS Microbiol Lett, 55:163-168.

48. Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented diary products. *FEMS Microbiol Rev*, 46:343-356.
49. Fitzgerald RJ, Jordan HV, Archad HO. 1966. Dental caries in gnotobiotic rats infected with variety of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch oral Biol*, 11:473-476.
50. Franciosi RA, Knostman JD, Zimmerman RA. 1973. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr*, 82:707-718.
51. Fredericq P. 1948. Actions antibiotiques réciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Rev Belge Pathol*, 4:1-107.
52. Fritsche W, Laplace F. 2002. *Mikrobiologie*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer-Verlag, 46-51.
53. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66:365-378.
54. Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyn G, Banoczy G. 1999. Association between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in hungarian adolescents. *J Dent Res*, 33:191-195.
55. Geraeu RE, Mackel DC, Boring JR, Payne FJ, Hammett FL. 1959. The aquisition of fecal flora by infants from their mother during birth. *J Pediatr*, 54:313-318.
56. Gevers D, Huys G, Swings J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 205(1):31-36.
57. Glass RL. 1952. Lack of correlation between salivary lactobacillus counts and dental caries activity. *Oral Surg Oral Med Oral Path*, 5:210-213.
58. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet*, 2(8574):1519.

-
59. Gratia A, Fredericq P. 1946. Diversità des souches antibiotiques de *B. coli* et étendue variable de leur champs d'action. *C R Soc Biol*, 140:1032-1033.
 60. Green GE, Weisensteiner PR, PermarD. 1957. Studies on salivary lactobacilli and dental caries in children during a dentifrice test program. *J Dent Res*, 36:828-838.
 61. Guarner F. 2002. The colon as an organ: habitat of bacterial flora. *Nutr Hosp*, 17(2):7-10.
 62. Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B. 1954. The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand*, 11(3-4):232-64.
 63. Hadley FP. 1933. A quantitative method for estimating bacillus acidophilus in saliva. *J Dent Res*, 13: 415-428.
 64. Hardie JM, Bowden GH. 1974. The normal microflora of the mouth. In: Skinner FA, Carr JG, Hrsg. *The normal microflora of man*. London: Academic Press, 47-83.
 65. Hamada S, Slade HD. 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44:331-384.
 66. Hammes WP, Weiss N, Holzapfel WH. 1992. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, Hrsg. *The Prokaryotes*. Zweite Auflage. New York: Springer-Verlag, 1535-1590.
 67. Hastings JW, Holzapfel WH. 1986. Conventional of lactobacilli surviving radurization of meat. *J Appl Bacteriol*, 62:209-216.

-
68. Hauer E. 1997. Orale Laktobazillenbefunde zur Vorhersage eines Kariesrisikos- Eine klinisch-mikrobiologische Untersuchung [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
 69. Hebert EM, Raya RR, Tailliez de Giori GS. 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *Int J Food Microbiol*, 59(1-2):19-27.
 70. Heinrich R, Kneist S. 1986. Die Vitalerhaltung des Milchendodonts – Eine klinisch-mikrobiologische und histologische Studie. [Habilitation]. Jena/Erfurt: Friedrich-Schiller-Universität.
 71. Heinrich-Weltzien R, Kneist S, Fischer Th, Stößer L. 1998. Ist eine effektive Kariesprävention ohne Fissurenversiegelung möglich. *Quintessenz*, 11:1099-1108.
 72. Heinrich-Weltzien R, Kühnisch J, Senkel H, Stößer L. 1998. Welchen Beitrag leistet die Fissurenversiegelung zur Zahngesundheit. *Oralprophylaxe Kinderzahnheilkd*, 20:146-154.
 73. Hellwig E, Klimek J, Attin Th. 1999. Einführung in die Zahnerhaltung. Zweite Aufl. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 12-22.
 74. Holzapfel WH, Haberer P, Snet J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ. 1997. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*, 41:85-101.
 75. Ikeda T, Sandham HJ. 1972. A medium for the recognition and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 17:601-604.
 76. Irmisch B. 1992. Kariesprophylaxe mittels Fissurenversiegelung. *Dtsch Zahnärztl Z*, 47:790-793.
 77. Jakob F, Wollman EL. 1958. Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. *C.R. Acad Sci*, 247:154.

-
78. James SM, Tagg JR. 1988. A search within the genera *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* for organisms inhibitory to mutans streptococci. *Microbiol Ecol Health Dis*, 1:153-162.
 79. Jay P, Hadley FP, Bunting RW. 1936. Observation on relationship of *Lactobacillus acidophilus* to dental caries in children during experimental feeding of candy. *J Am Dent Assn*, 23:846-851.
 80. Jespersen L, Jakobsen M. 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int J Food Microbiol*, 33:139-155.
 81. Joerger MC, Klaenhammer TR. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol*, 167:439-446.
 82. Johnston MM, Kaake J, Agnew MC. 1933. The relationship of *Lactobacillus acidophilus* to dental caries in experimental animals and in human beings. *J Americ Dent Assoc*, 1777-1784.
 83. Jordan HV. 1986. Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in oral samples. *Oral Microbiol Immunol*, 1:23-27.
 84. Kandler O, Weiss N. 1986. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In: Sneath PHA, Mair N, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergeys manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1208-1234.
 85. Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, Itoh T. 1998. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Appl Environ Microbiol*, 70(5):2906-2911.

-
86. Kawai Y, Ishii Y, Arakawa K, Uemura K, Saitoh B, Nishimura J, Kitazawa H, Yamazaki Y, Tateno Y, Itoh T, Saito T. 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 70(5):2906-2911.
 87. Kesel RG, Shaklair IL, Englander HR. 1958. Further studies on oral lactobacilli counts after elimination of carious lesions. *J Dent Res*, 37:50-51.
 88. Keyes PH. 1962. Recent advances in dental caries research. *Int Dent J*, 12:443.
 89. Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, 70:337-349.
 90. Klimm W, Natusch I, Pöschmann M, Wichmann G. 1990. Kriterien des erhöhten Kariesrisikos bei der gezielten präventiv-kurativen Betreuung 16-35jähriger. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd*, 78:267-271.
 91. Klock B, Krasse B. 1977. Microbial and salivary conditions in 9- to 12-year-old children. *Scand J Dent Res*, 85:56-63.
 92. Kneist S, Heinrich R, Künzel W. 1987. Zum Vorkommen von Laktobazillen im kariösen Dentin. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd*, 75:25-30.
 93. Kneist S, Heinrich R, Künzel W. 1988. Zum Vorkommen von Laktobazillen im kariösen Dentin. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd*, 76:123-127.
 94. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Tietze W, Schumann V, Stöber L. 1998. Die mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung als Grundvoraussetzung des Kariesrisikos – Eine Übersicht der Befunde aus der Erfurter Studie. In: Stöber L, Hrsg. *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Berlin: Quintessenz Verlag, 201-213.
 95. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Laurisch L. 1999. Evaluation of a new caries risk test. *Independent Dent*, 4: 76-85.

-
96. Kneist S, Laurisch L, Heinrich-Weltzien R. 1999. Der neue CRT^R-Mikrobiologischer Hintergrund zum Nachweis von *S. mutans*. Oralprophylaxe, 21: 180-185.
 97. Knoke M, Bernhardt H. 1985. Mikroökologie des Menschen. Mikroflora bei Gesunden und Kranken. VCH Verlagsges, 21-39, 78-89.
 98. Köhler B, Bratthall D. 1978. Intrafamilial level of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. Scand J Dent Res, 86:35-42.
 99. Köhler B, Andreen I, Jonsson B. 1984. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *S. mutans* and lactobacilli in their children. Arch Oral Biol, 29:879-883.
 100. König K. 1971. Karies und Kariesprophylaxe. Erste Aufl. München: Goldmann.
 101. Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E, Kjaeldgaard M. 2004. High levels of salivary lactobacilli in Estonian schoolchildren. Eur J Pediatr Dent, 5(2):107-109.
 102. Krasse B. 1954. Relationship between caries activity and the number of lactobacilli in the oral cavity. Acta Odont Scand, 12:157-172.
 103. Krasse B. 1988. Oral Microflora: Establishment and Preventive Effects. In: The Regulatory and Protective Role of the normal Microflora. Stockton Press, 253- 260.
 104. Krasse B. 1988. Biological factors as indicators of future caries. Int Dent J, 38:219-225.
 105. Krishnakumar R, Singh S, Subba Reddy VV. 2002. Comparison of levels of *mutans streptococci* and lactobacilli in children with nursing bottle caries, rampant caries, healthy children with 3-5 dmft/DMFT and healthy caries free children. J Indian Soc Pedod Prev Dent, 20(1):1-5.

106. Kroonemann J, Faber F, Alderkamp AC, Oude Elferink SJHW, Driehuis F, Cleenwerck I, Swings J, Gottschal JC, Vancanneyt M. 2002. *Lactobacillus diolivorans* sp. Nov., a 1,2- propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int J System and Evol Microbiol*, 52:639-646.
107. Künisch J. 1998. Zahngesundheit sowie Häufigkeit und Qualität der Fissurenversiegelung bei 8- und 14jährigen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
108. Larmas M. 1975. A new dip-slide technic for counting of salivary lactobacilli. *Proc Finn Dent Soc*, 71 (2):31-35.
109. Larmas M. 1985. Simple tests for caries susceptibility. *Int Dent J*, 35 (2):109-117.
110. Leblanc L, Dufour E. 2002. Monitoring the identity of bacteria using their intrinsic fluorescence. *FEMS Microbiol Lett*, 211(2):147-153.
111. Lee J, Jang J, Kim B, Kim J, Jeong G, Han H. 2004. Identification of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* by multiplex PCR-based restriction enzyme analysis. *J Microbiol Methods*, 59(1):1-6.
112. Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produces by mikroorganisms. *Science*, 147:747-748.
113. Loesche WJ. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50:353-380.
114. Lortal S, Valence F, Bizet C, Maubois JL. 1997. Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Res Microbiol*, 148(6):461-474.
115. Lussi A, Schaffner M. 2002. Diagnose und Therapie der Karies. *Schweiz Med Forum*, 8:166-170.

116. Lussi A, Francescut P, Schaffner M. 2003. Neue und konventionelle Methoden zur Diagnose der Fissurenkaries. *Quintessenz*, 54 (10): 1037-1046.
117. Magitots. 1867. Wirkung der Gärungsproduktion auf verschiedene Gebiete der Mundhöhle. In: Miller WD, Hrsg. *Mikroorganismen der Mundhöhle*. Zweite Auflage. Leipzig: Thieme Verlag, 112-131.
118. Martínez-Anaya MA, Llin ML, Macías MP, Collar C. 1994. Regulation of acetic acid production by homo- and heterofermentative lactobacilli in whole-wheat sour-doughs. *Z Lebensm Unters Forsch*, 199:186-190.
119. Massi M, Vitali B, Federici F, Matteuzzi D, Brigidi P. 2004. Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina. *J Appl Microbiol*, 96(4):777-786.
120. Mata LJ, Mejicannos ML, Jimenez F. 1972. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatamalan children. *Am J Clin Nutr*, 25:1380.
121. Mc Donald LC, Mc Feeters RF, Daeschel MA, Fleming HP. 1987. A differential medium fort the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 53:1382-1384.
122. Merte A. 2003. Zur Transmission von Mutans-Streptokokken [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
123. Messens W, De VL. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. *Int J Food*, 72(1-2):31-43.
124. Metchnikoff E. 1908. *Prolongation of life*. New York. G. P. Putmans Sons (Ed).
125. Michalek SM, Hirasawa M, Kiyono H, Ochiai K, McGhee JR. 1981. Oral ecology and virulenca of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. *Infect Immun*, 33:690-696.

-
126. Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, Brassert D, Verdu E, Herranz M, Felley C, Porta N, Rouvet M, Blum AL, Cortesy-Theulaz I. 1999. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*, 60(3):203-209.
 127. Miller WD. 1889. *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*. Leipzig: Thieme Verlag.
 128. Montville TJ, Kaiser AL. 1993. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press Inc.
 129. Moore WEC, Holdman LV. 1974. Human fecal flora: The normal of 20 Japanese Hawaiians. *Appl Microbiol*, 27:961-979.
 130. Moore: VPI Broth-grown Anaerobe Library, 35°C, in PYG Broth. (BHIBLA) Database Version 3.8 January 1994; MIDI, 115 Barksdale Prof. Center Newark, DE 19711 USA.
 131. Morea M, Baruzzi F, Cappa F, Cocconcelli PS. 1998. Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. *Int J Food Microbiol*, 43:53-60.
 132. Moreira M, Abraham A, de Antoni G. 2000. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *J Dairy Sci*, 83:395-400.
 133. Mortvedt CI, Nes IF. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. *J Gen Microbiol*, 136:1601-1607.
 134. Mundt JO, Hammer JL. 1968. *Lactobacilli* on plants. *Appl Microbiol*, 16(9):1326-1330.

-
135. Nagano T. 1960. Relation between the form and pit and fissure and the primary lesion of caries. *Shikwa Gakuto*, 60:80-90.
 136. Nancy J, Dorignac G. 1992. Lactobacilli from the dentin and saliva in children. *J Clin Pediatr Dent*, 16:107-111.
 137. Nemcova R. 1997. Criteria for selection of Lactobacilli for probiotic use. *Vet Med*, 42(1):19-27.
 138. Nicolle P, Prunet J. 1964. La propriété colicinogène dans l' espèce *Salmonella typhi*. *Ann Inst Pasteur*, 170-174.
 139. Nomura M. 1964. Mechanism of action of colicines. *Proc Nat Acad Sci US*, 52:1514.
 140. Ocana VS, Nader Macias ME. 2004. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin -producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods Mol Biol*, 268:347-353.
 141. Oncag O, Alpoz AR, Eronat C. 2000. Salivary *Streptococcus mutans*, Lactobacilli levels and buffer capacity in children with esophageal burns. *J Clin Pediatr Dent*, 24(2):147-151.
 142. Orland FJ, Blayney JR, Harison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. 1954. Use of the germfree animal technic in the study of the experimental dental caries. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res*, 33:147-174.
 143. Orland FJ, Blayney JR, Harison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M. 1955. Experimental caries in germ free rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc*, 50:259-273.

144. Oust A, Moretro T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. 2004. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *Microbiol Methods*, 59(2):149-162.
145. Ozeki H, Stocker BAD, de Margerie H. 1959. Production of colicine by single bacteria. *Nat*, 184:337.
146. Pahlow G, Honig H. 1986. Wirkungsweise und Einsatzgrenzen von Silage-Impfkulturen aus Milchsäurebakterien. *Das wirtschaftseigene Futter*, 32:20-35.
147. Pasteur L, Joubert JF. 1877. Charbon et septicemie. *C R Soc Biol Paris*, 85.
148. Persin C. 1998. Probiotika. Stuttgart: Hippokrates Verlag, 1:87-91.
149. Rachman CN, Kabadjova P, Prevost H, Dousset X. 2003. Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *J Appl Microbiol*, 95(6):1207-1216.
150. Randazzo CL, Restuccia C, Romano AD, Caggia C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *Int J Food Microbiol*, 90(1):9-14.
151. Reddy GV, Shahani KM, Banerjee MR. 1973. Inhibitory effect of yoghurt on Ehrlich ascitis tumorcell proliferation. *J Nat Cancer Inst*, 50:815.
152. Reuter G. 1975. Classification problems, ecology and some biochemical activities of lactobacilli of meat products. In: Carr JG, Cutting CV, Whiting GC, Hrsg. *lactic acid bacteria in beverages and food*. London: Academic Press, 221-229.
153. Reuter G. 1997. Present and future of probiotics in Germany and in central Europe. *Biosci Microflora*, 16:43-51.

-
154. Riethe P. 1988. Langzeiterfahrungen mit kariesprophylaktischer Versiegelung. Dtsch Zahnärztl Z, 43:253.
 155. Robinson EL, Thompson WL. 1952. Effect of weight gain of the addition of *L. acidophilus* to formula of newborn children. J Pediatr, 41:395-398.
 156. Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains. Int J Syst Evol Microbiol, 55:197-207.
 157. Rogosa M, Mitchell JA, Wisemann RF. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and faecal *Lactobacilli*. J Bacteriol, 62: 132-133.
 158. Rogosa M, Wisemann R, Mitchell JA, Disrealy M. 1953. Species differentiation of oral *Lactobacilli* from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. J Bacteriol, 65:681-699.
 159. Rogosa M, Sharpe ME. 1959. An approach to the classification of the *Lactobacilli*. J Appl Bacteriol, 22:329-340.
 160. Roy D, Ward P, Vincent D, Mondou F. 2000. Molecular identification of potentially probiotic *Lactobacilli*. Curr Microbiol, 40:40-46.
 161. Rupf S, Kneist S, Merte K, Eschrich K. 1999. Quantitative determination of *Streptococcus mutans* by using competitive polymerase chain reaction. Eur J Oral Sci, 107:75-81.
 162. Rupf S. 2005. Geno- und Phänotypisierung oraler Bakterien mit Polymerasekettenreaktion und Massenspektrometrie- Einsatz moderner diagnostischer Methoden in der Zahnerhaltung [Habilitation]. Leipzig: Medizinische Fakultät Universität Leipzig.

-
163. Rupf S, Breitung K, Schellenberger W, Merte K, Kneist S, Eschrich K. 2005. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol*, 20:267-273.
164. Sabine DB. 1963. Antibiotika ähnliche Effekte von *L. acidophilus*. Product Development Laboratory, U.S. Vitamin and Pharmaceutical Corporation, Yonkers, New York.
165. Salminen S, von Wright A. 1998. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Zweite Auflage. New York.
166. Sarra PG, Dellaglio F. 1984. Colonization of a human intestine by four different genotypes of *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiologica*, 7(4):331-339.
167. Scharff S. 2004. Zur Bacteriocinproduktion von Mutans- und oralen Streptokokken [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
168. Scharff F. 2005. Zur Bacteriocinproduktion von oralen Aktinomyzeten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
169. Schlee D, Kleber HP. 1991. Wörterbücher der Biologie: Biotechnologie. Jena: Gustav Fischer Verlag.
170. Schlegel HG. 1985. Spezielle Gärungen - Alkoholgärung durch Hefe und Bakterien - Milchsäuregärung und *Lactobacteriaceae*. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
171. Seppä L, Luoma H, Forss H, Spets-Happonen S, Markkanen S, Pelkonen K. 1989. Invasion of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* in early caries lesions of gnotobiotic rats. *Caries Res*, 23:371-374.
172. Servin AL. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 28(4):405-440.

173. Shahani KM, Ayebo AD. 1980. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr*, 33:2448-2457.
174. Sharpe ME. 1962. Enumeration and studies of lactobacilli in food products. *Diary Sci*, 24:165-171.
175. Sharpae ME. 1981. The genus *Lactobacillus*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG, Hrsg. *The Prokaryotes*. Zweite Aufl. New York: Springer-Verlag, 1653-1674.
176. Shaw BG, Harding CD. 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J Appl Bacteriol*, 56:25-40.
177. Shovlin FE, Gillis RE. 1969. Biochemical and antigenic studies of lactobacilli isolates from deep dentinal caries. I Biochemical aspects. *J Dent Res*, 48:356-360.
178. Shovlin FE, Gillis RE. 1972. Biochemical and antigenic studies of lactobacilli isolates from deep dentinal caries. II Antigenetic aspects. *J Dent Res*, 51:356-360, 583-587.
179. Silva M, Jacobs NV, Deneke C, Gorbach SL. 1987. Antimicrobiol substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother*, 31(8):1231-1233.
180. Smith HW. 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J Pathol Bacteriol*, 90:495-513.
181. Smith SI, Aweh AJ, Coker AO, Savage KO, Abosede DA, Oyedeji KS. 2001. Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios*, 105(411):77-85.
182. Snyder ML. 1951. Laboratory methods in the clinical evaluation of caries activity. *J Am Dent Assoc*, 42:400-413.

183. Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett*, 187(2):167-173.
184. Spicher G. 1984. Die Mikroflora des Sauerteiges. *Z Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 178:106-109.
185. Spicher G. 1987. Die Mikroflora des Sauerteiges. XXII. Mitteilung: Die in Weizensauerteigen vorkommenden Laktobazillen. *Z Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 184:300-304.
186. Steiner M, Menghini G, Curilovic Z, Marthaler T. 1994. Der Kariesbefall der Schüler der Stadt Zürich im Zeitraum 1970-1993. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 104 (10):1210-1218.
187. Steinle CJ, Madonia JV, Bahn AN. 1967. Relationship of lactobacilli to the carious lesion. *J Dent Res*, 46:191-196.
188. Stöber L, Rohland F, Seyfarth W. 1989. Gaschromatographische Analyse des Produktspektrums von *S. mutans* aus Glucose. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd*, 77:309-311.
189. Stöber L. 1998. *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Berlin, Chicago, London: Quintessenz Verlag.
190. Strus M, Pakosz K, Gosciniak H, Przondo-Mordarska A, Rozynek E, Pituch H, Meisel-Mikolajczyk F, Heczko PB. 2001. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Med Dosw Microbiol*, 53(2):133-142.

191. Suma K, Misra MC, Varadaraj MC. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int J Food Microbiol*, 40(1-2):17-25.
192. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40:722-756.
193. Tahara T, Kanatani K. 1997. Isolation and partial amino acid sequence of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(5):884-886.
194. Tannock GW. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol*, 1(1-2):53-64.
195. Theunissen J, Britz TJ, Torriani S, Witthuhn RC. 2005. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int J Food Microbiol*, 98(1):11-21.
196. Tietze W, Schumann V, Stöber L. 1998. Die mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung als Grundvoraussetzung des Kariesrisikos – Eine Übersicht der Befunde der Kinder aus der Erfurter Studie. In: Stöber L, Hrsg. *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Berlin: Quintessenz Verlag, 201-213.
197. Tilbury RH. 1975. Occurrence and effect of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: Carr J G, Cutting CV, Whiting GC (eds.): *Lactic acid bacteria in beverages and food*. London: Academic Press, 177-191.
198. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2002. *Microbiology-An introduction*. 7. Aufl. Boston, New York: Benjamin Cummings Verlag, 240-241.
199. Turksel Dulgergil C, Satıcı O, Yildirim I, Yavuz I. 2004. Prevention of caries in children by preventive and operative dental care for mothers in rural Anatolia, Turkey.[Abstract]. Diyarbakir, Turkey: University of Kirikkale, Dental Faculty.

-
200. Upreti GC, Hindsdill RD. 1973. Produktion and mode of action of Lactocin 27 Bacteriocin from a homofermentative lactobacillus. *Antimikrob Agents Chemother*, 7:139-145.
201. Van Houte J. 1980. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J*, 30:305-326.
202. Van Loveren C, Straetemans MME, Buijs JF. 1999. Similarity of mutans streptococci in mothers and children who acquired mutans streptococci after the age of 5. *Caries Res*, 33:281.
203. Van Loveren C, Buijs JF, ten Cate CN. 2000. Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after age of 5. *Caries Res*, 34:482-485.
204. Vincent JG, Veomett RC, Riley RF. 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol*, 78:477-484.
205. Weinrichter B, Sollberger H, Ginzinger W, Jaros D, Rohm H. 2004. Adjunct starter properties affect characteristic features of Swiss-type cheeses. [Abstract]. BOKU-University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria.
206. Wheeler DM, Hirsch A, Mattick ATR. 1951. „Lactobacillin“, an antibiotic from lactobacilli. *Nat*, 168,659.
207. Willis AT, Bullen CL, Williams K, Fagg CG, Bourne A, Vignon M. 1973. Breast milk substitute: A bacteriological study. *Br Med J*, 4:67-72.
208. Wood BJB. 1985. *Mikrobiology of fermented foods*. Vol.1. London, New York, Elsevier.

-
209. Yoshizumi H. 1975. A malo lactic bacterium and its growth factor. In: Carr JG, Cutting CV, Whiting GC, eds. Lactic acid bacteria in beverages and food. London, New York, SF: Academic Press, 87-102.
210. Zamfir M, Callewaert R, Cornea PC, Savu L, Vatafu I, De Vuyst L. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. J Appl Microbiol, 87(6):923-931.
211. Zeeck A, Eick S, Krone B, Schröder K. 1990. Chemie für Mediziner. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg Verlag, 243-247.

9. Anhang

Tabelle 27: Hemmhofdurchmesser (in mm) bei Indikatorstämmen von Mutans-Streptokokken (¹ Serotyp) durch Bacteriocine von Laktobazillen

Test- stämmе	Indikatorstämmе							
	S. mutans				S. sobrinus			
	NCTC 10449 (c) ¹	Ingbritt	LM7 (e) ¹	V100	QP 50-1 (f) ¹	SE11	OMZ 176 (d) ¹	OMZ 65 (g) ¹
L. acidophilus DSMZ 20079	-	-	-	-	-	-	-	-
L. alimentarius DSMZ 20181	-	-	10	-	-	-	-	-
L. brevis DSMZ 20054	-	-	-	-	-	-	-	-
L. buchneri DSMZ 20057	-	-	-	-	-	-	-	-
L. casei DSMZ 20011	-	10	-	-	-	-	11	-
L. rhamnosus (L. casei ss rhamnosus) DSMZ 20021	-	-	-	-	-	-	-	-
L. coryniformis ss coryniformis DSMZ 20001	-	-	10,5	-	-	-	-	-

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 27: Hemmhofdurchmesser (in mm) bei Indikatorstämmen von Mutans-Streptokokken (¹ Serotyp) durch Bacteriocine von Laktobazillen

Test- stämmе	Indikatorstämmе							
	S. mutans				S. sobrinus			
	NCTC 10449 (c) ¹	Ingbritt	LM7 (e) ¹	V100	QP 50-1 (f) ¹	SE11	OMZ 176 (d) ¹	OMZ 65 (g) ¹
L. coryniformis ss torquens DSMZ 20004	-	-	11	-	-	-	-	-
L. delbrueckii ss bulgaricus DSMZ 20080	-	-	11	-	-	-	-	-
L. delbrueckii ss delbrueckii DSMZ 20074	-	-	-	-	-	-	-	-
L. delbrueckii ss lactis DSMZ 20072	-	-	-	-	-	-	-	-
L. gasseri DSMZ 20077	-	-	-	-	-	-	-	-
L. paracasei ss paracasei DSMZ 5457	10	11	10	-	-	-	-	-
L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 27: Hemmhofdurchmesser (in mm) bei Indikatorstämmen von Mutans-Streptokokken (¹ Serotyp) durch Bacteriocine von Laktobazillen

Test- stämmе	Indikatorstämmе							
	S. mutans						S. sobrinus	
	NCTC 10449 (c) ¹	Ingbritt	LM7 (e) ¹	V100	QP 50-1 (f) ¹	SE11	OMZ 176 (d) ¹	OMZ 65 (g) ¹
L. paracasei ss tolerans DSMZ 20012	-	-	-	-	-	-	-	-
L. plantarum DSMZ 2601	10,5	10	10	10	12	13	10	-
L. reuteri DSMZ 20016	-	-	-	-	-	-	-	-
L. rhamnosus DSMZ 20022	-	-	10	-	-	-	-	-
L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555	10	11	11,5	10	11	-	12	-
L. zeae DSMZ 20187	-	-	-	-	-	-	10	-

Tabelle 28: Hemmhofdurchmesser (in mm) bei Indikatorstämmen von *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* und *S. salivarius* durch Bacteriocine von Laktobazillen

Test- stämme	Indikatorstämme						
	<i>S. sanguis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. mitis</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. salivarius</i>
	OMZ 9S	HG1473	HG1290	HG1601	OMZ8	HG295	OMZ47
<i>L. acidophilus</i> DSMZ 20079	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. alimentarius</i> DSMZ 20181	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> DSMZ 20054	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. buchneri</i> DSMZ 20057	19	18	19,5	16,5	-	-	-
<i>L. casei</i> DSMZ 20011	12,5	-	12	11	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> (<i>L. casei</i> ss <i>rhamnosus</i>) DSMZ 20021	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i> DSMZ 20001	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 28: Hemmhofdurchmesser (in mm) bei Indikatorstämmen von *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* und *S. salivarius* durch Bacteriocine von Laktobazillen

Test- stämmе	Indikatorstämmе						
	<i>S. sanguis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. mitis</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. salivarius</i>
	OMZ 9S	HG1473	HG1290	HG1601	OMZ8	HG295	OMZ47
<i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i> DSMZ 20004	-	-	-	9,5	10,5	10	-
<i>L. delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i> DSMZ 20080	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> ss <i>delbrueckii</i> DSMZ 20074	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i> DSMZ 20072	-	12	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> DSMZ 20077	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i> DSMZ 5457	-	10,5	-	9	-	-	-
<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i> DSMZ 20008	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 28: Hemmhofdurchmesser (in mm) bei Indikatorstämmen von *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* und *S. salivarius* durch Bacteriocine von Laktobazillen

Test- stämmе	Indikatorstämmе						
	<i>S. sanguis</i>		<i>S. oralis</i>		<i>S. mitis</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. salivarius</i>
	OMZ 9S	HG1473	HG1290	HG1601	OMZ8	HG295	OMZ47
<i>L. paracasei</i> ss tolerans DSMZ 20012	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> DSMZ 2601	15	14	16,5	13	16	-	-
<i>L. reuteri</i> DSMZ 20016	11	11	12	11	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> DSMZ 20022	8	9	10	10	-	-	-
<i>L. salivarius</i> ss salivarius DSMZ 20555	-	14	13	12,5	13	11	10,5
<i>L. zeae</i> DSMZ 20187	19	16	19	20,5	-	-	-

Tabelle 29: Mittelwerte und Standardabweichung der gebildeten Hemmhöfe im Bakterienrasen der Streptokokkenstämme (Indikatorstämme) durch die jeweilige Laktobazille

Teststämme	Mittelwert (mm)	Standardabweichung (mm)
DSMZ 20001 <i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i>	10,5	
DSMZ 20004 <i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>	10,5	0,5
DSMZ 20011 <i>L. casei</i>	11,3	0,97
DSMZ 20016 <i>L. reuteri</i>	11,25	0,5
DSMZ 20022 <i>L. rhamnosus</i>	10	
DSMZ 20057 <i>L. buchneri</i>	18,25	1,32
DSMZ 20072 <i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i>	12	
DSMZ 20080 <i>L. delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i>	11	
DSMZ 20181 <i>L. alimentarius</i>	10	
DSMZ 20187 <i>L. zeae</i>	16,9	4,19
DSMZ 20555 <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	11,6	1,28
DSMZ 2601 <i>L. plantarum</i>	12,5	
DSMZ 5457 <i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>	10,38	0,48

Tabelle 30: Mittelwerte und Standardabweichung der durch bacteriocinogene Laktobazillen gebildeten Hemmhöfe bei den jeweiligen Streptokokkenstämmen- bzw. arten

Indikatorstämme	Mittelwert (mm)	Standardabweichung (mm)
S. mutans (c) NCTC10449	10,2	0,3
S. mutans (c) Ingbritt	10,5	0,6
<i>S. mutans (c) gesamt</i>	10,4	0,5
S. mutans (e) LM7	10,5	0,6
S. mutans (e) V100	10	0
<i>S. mutans (e) gesamt</i>	10,4	0,6
S. mutans (f) QP50-1	11,5	0,7
S. mutans (f) SE11	13	0
<i>S. mutans (f) gesamt</i>	12	1
<i>S. mutans gesamt</i>	10,6	0,8
S. sobrinus (d) OMZ 176	10,75	1
S. sanguis OMZ 9S	15,3	3,7
S. sanguis HG1473	13,6	2,7
<i>S. sanguis gesamt</i>	14,3	3,1
S. oralis HG1290	14,6	3,7
S. oralis HG1601	13,5	3,7
<i>S. oralis gesamt</i>	14	3,6
S. mitis OMZ 8	13,2	2,8
S. gordonii HG295	10,5	0,7
S. salivarius OMZ 47	10,5	0

Tabelle 31: Laktobazillen – Datenbank des Microbiol Identification System

Taxon

Lactobacillus acetolerans
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus agilis
Lactobacillus alimentarius
Lactobacillus amylophilus
Lactobacillus amylovorus
Lactobacillus animalis
Lactobacillus aviarius ss araffinosus
Lactobacillus aviarius ss aviaries
Lactobacillus bavaricus
Lactobacillus bif fermentans
Lactobacillus brevis
Lactobacillus buchneri
Lactobacillus bulgaricus (Lactobacillus delbrueckii ss bulgaricus)
Lactobacillus carnis (carnobacterium piscicola)
Lactobacillus casei (Lactobacillus casei ss casei)
Lactobacillus casei ss alactosus (Lactobacillus paracasei ss paracasei)
Lactobacillus casei ss pseudopantarum (Lactobacillus paracasei ss paracasei)
Lactobacillus casei ss rhamnosus (Lactobacillus rhamnosus)
Lactobacillus casei ss tolerans (Lactobacillus ss paracasei)
Lactobacillus cateniformis
Lactobacillus cellobiosus
Lactobacillus collinoides
Lactobacillus confuses (Weisella confuse)
Lactobacillus coryniformis ss coryniformis
Lactobacillus coryniformis ss torquens
Lactobacillus crispatus
Lactobacillus curvatus
Lactobacillus delbrueckii (Lactobacillus delbrueckii ss delbrueckii)
Lactobacillus delbrueckii ss bulgaricus (Lactobacillus bulgaricus)

Taxon

Lactobacillus delbrueckii ss delbrueckii
Lactobacillus delbrueckii ss lactis (Lactobacillus lactis)
Lactobacillus divergens (Carnobacterium)
Lactobacillus farciminis
Lactobacillus fermentum
Lactobacillus fructivorans
Lactobacillus fructosus
Lactobacillus gallinarum
Lactobacillus gasseri
Lactobacillus graminis
Lactobacillus halotolerans (Weissella; Lactobacillus viridescens ss halotolerans)
Lactobacillus hamsteri
Lactobacillus helveticus
Lactobacillus heterohochii (Lactobacillus fructivorans)
Lactobacillus hilgardii
Lactobacillus homohiochi
Lactobacillus intestinalis
Lactobacillus jenesenii
Lactobacillus johnsonii
Lactobacillus kandleri (Weissella)
Lactobacillus kefir
Lactobacillus kefiranofaciens
Lactobacillus kefirgranum
Lactobacillus lactis (Lactobacillus delbrueckii ss lactis)
Lactobacillus leichmannii (Lactobacillus delbrueckii ss lactis)
Lactobacillus malefermentans
Lactobacillus mali
Lactobacillus maltaromicus
Lactobacillus minor (Weissella; Lactobacillus viridescens ss minor)
Lactobacillus minutum (Atopobium)

Taxon

Lactobacillus murinus
Lactobacillus oris
Lactobacillus panis
Lactobacillus parabuchneri
Lactobacillus paracasei ss paracasei (Lactobacillus casei ss casei)
Lactobacillus paracasei ss tolerans (Lactobacillus casei ss tolerans)
Lactobacillus parakefir
Lactobacillus paraplantarum
Lactobacillus pentosus
Lactobacillus piscicola (Carnobacterium)
Lactobacillus pontis
Lactobacillus reuteri
Lactobacillus rhamnosus (Lactobacillus casei ss rhamnosus)
Lactobacillus rimae (Atopobium
Lactobacillus rogosae
Lactobacillus rumini
Lactobacillus sake
Lactobacillus salivarius ss salicinius
Lactobacillus salivarius ss salivarius
Lactobacillus sanfransisco
Lactobacillus sharpeae
Lactobacillus suebicus
Lactobacillus trichodes (Lactobacillus fructivorans)
Lactobacillus uli
Lactobacillus vaccinostrercus
Lactobacillus vaginalis
Lactobacillus viridescens (Weissella)
Lactobacillus vitulinus
Lactobacillus xylosus (Lactococcus lactis ss lactis)
Lactobacillus yamanashiensis (Lactobacillus mali)
Lactobacillus zeae

Reagenzien zur Aufarbeitung der Kulturen für den Gaschromatograph

Reagenz 1

NaOH Plättchen	45 g	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Methan	150 ml	J. T. Baker, Deventer, Holland
Aqua dest.	150 ml	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Reagenz 2a

6N Salzsäure	325 ml	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	275 ml	J. T. Baker, Deventer, Holland

Reagenz 2b

50%ige Schwefelsäure	325 ml	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	275 ml	J. T. Baker, Deventer, Holland

Reagenz 3

Hexan	200 ml	J. T. Baker, Deventer, Holland
Methyl-tert-butyl-ether (MTBE)	200 ml	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Reagenz 4

Natriumhydroxid	5,4 g	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	450 ml	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Aufarbeitung der Kulturen

1. Ernte

- Aufschütteln der PYG- Tween Kulturröhrchen
- Überführen in Zentrifugengläser und 5 min Zentrifugieren (4000U/min)
- Überstand verwerfen und Bodensatz mit 3ml 0,5% MgSO₄-Lsg. resuspendieren
- Überführen in Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss
- Zentrifugieren und Überstand verwerfen

2. Verseifung

- 1 ml Reagenz 1 hinzufügen
- 5-10 sek. schütteln
- im H₂O-Bad bei 100 Grad 5 min kochen lassen
- 10 sek. schütteln, dann weitere 25 min bei 100 Grad kochen
- Abkühlen lassen

3. Methylation

- Je 1 ml Reagenz 2a und 2b hinzufügen
- 5-10 sek. schütteln
- im H₂O-Bad bei 80 Grad 10 min kochen lassen
- Abkühlen unter fließendem, kaltem H₂O

4. Extraktion

- 1,25 ml Reagenz 3 hinzufügen
- 10 min über Kopf schütteln
- Entfernen der unteren Phase mit jeweils einer neuen Pipette

5. Waschlauge

- 3 ml Reagenz 4 hinzufügen
- 5 min über Kopf schütteln
- 5 min Zentrifugieren (4000U/min)
- 2/3 der oberen Phase mit der Glaspipette in GC Probenröhrchen überführen
- Verschließen der Probenröhrchen mit einer Plastikkappe und Einordnen in das Probetablett
- Abdecken des Probenröhrchens mit Parafilm und Lagerung im Kühlschrank (+4°C)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Hesse
Geburtsdatum/ ort: 13.09.1980 in Weimar
Familienstand: ledig
Wohnort: Zum Nordhang 3
99428 Weimar – Tröbsdorf

Schulausbildung

09/1987 – 08/1988 Marschall-Schukow-Oberschule Suhl
09/1988 – 08/1990 17. Oberschule Suhl-Nord
09/1990 – 08/1991 Schule Niederzimmern
09/1991 – 06/1999 Staatliches Sophien-Gymnasium Weimar
30. Juni 1999 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1999 – 01/2005 Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Januar 2005 Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin
seit 08/2003 Beginn mit der experimentellen Arbeit zum Promotionsthema
„Virulenz und Identifikation von oralen Laktobazillen“

Berufstätigkeit

seit 01.09.2005 Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. med. dent. M. Heller
in Neuhaus am Rennweg

Jena, den

Sabine Hesse

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alexandra Uhlemann
Geburtsdatum/ ort: 23.10.1980 in Plauen
Familienstand: ledig
Wohnort: Neundorfer Straße 165
08523 Plauen

Schulausbildung

09/1987 – 08/1992 Ernst-Thälmann-Oberschule Syrau
09/1992 – 07/1999 Diesterweg-Gymnasium Plauen
15. Juli 1999 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1999 – 01/2005 Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Januar 2005 Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin
seit 08/2003 Beginn mit der experimentellen Arbeit zum Promotionsthema
„Virulenz und Identifikation von oralen Laktobazillen“

Berufstätigkeit

seit 01.04.2005 Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. med. dent. I. Benecke
in Plauen

Jena, den

Alexandra Uhlemann

Danksagung

Frau Professor Dr. rer. nat. habil. Susanne Kneist, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten - Biologisches Labor, danken wir für die Vergabe des Themas, ihr Interesse am Gelingen der Arbeit und für die wissenschaftliche Diskussion bei der Niederschrift der Arbeit.

Den Assistentinnen im mikrobiologischen Labor, insbesondere Frau Ilona Albert, Frau Katrin von Brandenstein, Frau Regina Mäuer und Frau Martina Pötschke danken wir für die Einarbeitung in die mikrobiologischen Arbeitstechniken und ihre Unterstützung und Beratung während der experimentellen Arbeitsphase.

Ein besonderer Dank gilt unseren Eltern Andrea und Andreas Uhlemann sowie Evelyn und Christian Hesse für ihre Unterstützung.

Jena, den

Sabine Hesse

Jena, den

Alexandra Uhlemann

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Alexandra Uhlemann, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und dass ich die Kapitel 4.1 – Methodisches Vorgehen zur chemotaxonomischen Identifizierung oraler Laktobazillen mittels Membranfettsäurespektrum, 5.1 – Zur chemotaxonomischen Identifizierung der Referenzstämme, 5.1.1 – Auswertung der Qualitätskriterien „Similarity Index“ und „Euklid Distanz“ selbst angefertigt habe und die Kapitel 1 – Zusammenfassung, 2 – Einleitung, 2.1 - Zum ubiquitären Vorkommen von Laktobazillen, 2.2 – Zum Vorkommen von Laktobazillen im menschlichen Körper, 2.3 – Laktobazillen und ihre Bedeutung als Probiotika, 2.4 – Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen, 3 – Zielstellung, 6 – Diskussion, 7 – Schlussfolgerung, 8 – Literaturverzeichnis und 9 – Anhang in Zusammenarbeit mit Sabine Hesse angefertigt habe, alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in unserer Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Susanne Kneist, Frau Ilona Albert, Frau Katrin Brandenstein, Frau Regina Mäuer und Frau Martina Pötschke, ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Alexandra Uhlemann

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sabine Hesse, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und dass ich die Kapitel 4.2 - Untersuchungen zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen, 4.2.1 - Methodisches Vorgehen zur Testung der Bacteriocinproduktion, 4.2.2 - Evaluierung der Hemmhöfe, 5.2 - Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen, 5.2.1 - Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. mutans*, 5.2.2 - Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. sobrinus*, 5.2.3 - Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. sanguis*, 5.2.4 - Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. oralis*, 5.2.5 - Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. mitis* und *S. gordonii*, 5.2.6 - Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber *S. salivarius*, 5.3 - Synopse der Befunde, selbst angefertigt habe und die Kapitel 1 – Zusammenfassung, 2 – Einleitung, 2.1 - Zum ubiquitären Vorkommen von Laktobazillen, 2.2 – Zum Vorkommen von Laktobazillen im menschlichen Körper, 2.3 – Laktobazillen und ihre Bedeutung als Probiotika, 2.4 – Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen, 3 – Zielstellung, 6 – Diskussion, 7 – Schlussfolgerung, 8 – Literaturverzeichnis und 9 – Anhang in Zusammenarbeit mit Alexandra Uhlemann angefertigt habe, alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in unserer Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Susanne Kneist, Frau Ilona Albert, Frau Katrin Brandenstein, Frau Regina Mäuer und Frau Martina Pötschke, ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Sabine Hesse

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat
CFU	Einheit für die Anzahl der Mikroorganismen (colony forming unit = Kolonie bildende Einheit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ED	Euklid Distanz
GC	Gaschromatograph
HHD	homofermentativ-heterofermentatives Differentialmedium
L.	Lactobacillus
MIDI	Microbial Identification System
MRS	Laktobazillenmedium nach deMan et al. (1959)
MW	Mittelwert
NCTC	National Collection of Typ Cultures (London, England)
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PYGT	Peptone-Yeast-Extrakt-Tween-80-Bouillon
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA Methode
REA	Restriktionsendonukleaseanalyse
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Streptococcus
SD	Standardabweichung
SI	Similarity Index
SM	Streptococcus mutans
TSB	Trypticase-Soja-Bouillon
ss	Subspezies

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

	Seite
1 Zusammenfassung	5
2 Einleitung	8
2.1 Zum ubiquitären Vorkommen von Laktobazillen	10
2.2 Zum Vorkommen von Laktobazillen im menschlichen Körper	14
2.3 Laktobazillen und ihre Bedeutung als Probiotika	16
2.4 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen	20
3 Zielstellung	25
4 Material und Methoden	27
4.1 Methodisches Vorgehen zur chemotaxonomischen Identifizierung oraler Laktobazillen mittels Membranfettsäurespektrum	27
4.2 Untersuchungen zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen	29
4.2.1 Methodisches Vorgehen zur Testung der Bacteriocinproduktion	30
4.2.2 Evaluierung der Hemmhöfe	31
5 Ergebnisse	32
5.1 Zur chemotaxonomischen Identifizierung der Referenzstämme	32
5.1.1 Auswertung der Qualitätskriterien „Similarity Index“ und „Euklid Distanz“	36
5.2 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen	43
5.2.1 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber <i>S. mutans</i>	44
5.2.2 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber <i>S. sobrinus</i>	48
5.2.3 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber <i>S. sanguis</i>	49
5.2.4 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber <i>S. oralis</i>	51
5.2.5 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber <i>S. mitis</i> und <i>S. gordonii</i>	53
5.2.6 Zur Bacteriocinogenität der Laktobazillen gegenüber <i>S. salivarius</i>	55
5.3 Synopse der Befunde	56
6 Diskussion	62
7 Schlussfolgerung	83
8 Literaturverzeichnis	84

Einzelbefunde (Tabellen)
Verwendete Rezepturen und Medien
Lebenslauf
Danksagung
Ehrenwörtliche Erklärung